UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DER NIKKOMYCINBILDUNG UND OPTIMIERUNG EINER pO_2-FEEDING-FERMENTATION

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

ROLAND KURTH
aus Essen

1981

81 395

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 8. 1981

Dekan : Prof. Dr. A. Hager

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zähner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Poralla

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die großzügige Förderung und die vielen wertvollen Diskussionen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Zähner herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. H.-P. Fiedler für die Bereitstellung und Betreuung der HPLC-Analytik. Frl. A. Döhle danke ich für deren Durchführung.

Für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Fermentationstechnik danke ich Herrn Dr. W. Dehler.

Den übrigen Mitarbeitern des Nikkomycin-Teams, Dipl. Biol. J. Delzer, Dipl. Biol. J. Langhärig, Dipl. Biol. H. Müller und Dr. W. Zitzmann, gilt mein Dank für ihre stetige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn R. Utz möchte ich mich ebenfalls besonders bedanken. Er führte seit Sept. 1980 gewissenhaft einen Teil der Fermentationen durch und unterstützte mich engagiert bei der Organisation und Instandhaltung der Fermentationsabteilung.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	
1.	Chemikalien	9
2.	Mikroorganismen	10
3.	Nährmedien	12
4.	Kulturbedingungen Tü 901	14
4.1.	Schrägröhrchen und Platten	14
4.2.	Anzucht von Kulturen zur Gewinnung von Sporen	14
4.3.	Schüttelkolbenversuche	14
4.4.	resting-cell Versuche	15
4.5.	Fermentation (20 l)	15
4.5.1.	batch-Fermentation	15
4.5.2.	pO_2-feeding-Fermentation	17
5.	Kulturbedingungen von Test-organismen	18
5.1.	Herstellung von Testplatten mit Bakterien und hefeartig wachsenden Pilzen	18
5.2.	Herstellung von Testplatten mit Mucor hiemalis Tü 179 und Tü 180	18
6.	Meß- und Regelvorgänge am 20 l-Fermenter	19
6.1.	pH-Messung und Regelung	19
6.2.	pO_2-Messung und Regelung	19
6.3.	Bestimmung des Luftvolumens	19
7.	Untersuchungen der Fermentations-proben	20
7.1.	Myzeltrockengewicht	20
7.2.	Nikkomycinbestimmung	20
7.2.1.	Plattendiffusionstest	20
7.2.2.	HPLC	21
7.3.	Phosphatbestimmung	21

Seite

7.4. Stärkebestimmung 21
7.5. Mannitbestimmung 21
7.6. Stickstoffbestimmung 22
7.7. Viskositätsmessung 22
8. Mutagenese 22
9. Aminosäurepoolbestimmung 22
9.1. Zellaufschluß 23
9.2. Aminosäureanalyse 23
10. ^{14}C-Einbauversuch 23
11. Isolierung und Charakterisierung von Nikkomycin Z 24
11.1. Aufarbeitung 24
11.2. UV-Spektrum 25
11.3. IR-Spektrum 25
11.4. Bestimmung des Wirkungsspektrums im Vergleich mit Nikkomycin X 25
12. Dünnschichtchromatographie 26

III. ERGEBNISSE

1. Klonierung des Stammes Tü 901 27
2. Suche nach einem definierten Medium 29
3. batch-Fermentation auf definiertem Medium 31
4. Einfluß der Phosphat-Ionen-Konzentration auf die Nikkomycin-Bildung 32
5. batch-Fermentation auf komplexem Medium 34
6. "feed"-Prozesse - ein methodischer Überblick 39
7. pO_2-feeding Fermentation auf komplexem Medium 42
8. Entwicklung eines resting-cell Systems 44
9. Verfütterung potentieller Vorstufen und Suche nach Effektoren der Nikkomycin-Synthese im resting-cell 47

Seite

10. pO_2-feeding-Fermentation unter Zusatz von L-Leucin zur feeding-Lösung 49

11. pO_2-feeding bei verschiedenen pO_2-Sollwerten 52

12. Ermittlung des günstigsten Zeitpunktes zum pO_2-feeding Beginn 53

13. Uracil-Verfütterung in Schüttelkolbenversuchen auf komplexem Medium 54

14. Uracil-Verfütterung während der Produktionsphase 55

15. Untersuchung des Einflusses von L-Leucin auf die Nikkomycin Z Bildung im resting-cell 58

16. pO_2-feeding-Fermentation zur selektiven Produktion von Nikkomycin Z 59

17. Isolierung von Nikkomycin Z 61

18. UV- und IR-Spektren von Nikkomycin Z 62

19. Wirkungsspektrum-Vergleich Nikkomycin Z und X 63

20. Weitere Untersuchungen zum Einfluß von verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Nikkomycin-Synthese 65

21. Einbauversuch mit L-[U-^{14}C]Isoleucin, L-[U-^{14}C]Leucin und L-[U-^{14}C]Valin 68

22. pO_2-feeding-Fermentation mit L-Isoleucin resp. L-Leucin in der feeding-Lösung 70

23. Zusatz von L-Isoleucin zu verschiedenen Zeitpunkten 72

24. Einzel- und Kombinationsverfütterungen im resting-cell 74

25. Aminosäurepool-Bestimmung 77

26. Verfütterung von Strukturanalogen der verzweigtkettigen Aminosäuren 80

27. Einfluß einer schnell verwertbaren N-Quelle auf die Nikkomycin-Bildung 82

IV. DISKUSSION 84

V. ZUSAMMENFASSUNG 101

VI. LITERATUR 103

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

CBS	Centralbureau voor Schimmelcultures, Baam, Niederlande
cpm	counts per minute
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen Berlin, Göttingen
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
MES	2-(N-Morpholino)äthansulfonsäure
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mPa·s	Millipoise ≙ Millipascalsekunde
N	Gesamtstickstoff
P_i	anorganisches Phosphat
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
rpm	revolutions per minute
TES	N-((Trishydroxymethyl)methyl)-2-aminoäthansulfonsäure
TG	Trockengewicht
t(h)	Fermentationszeit in Stunden
Tü	Stammsammlung des Institutes für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Tübingen
vvm	Volumen Luft pro Volumen Nährlösung pro Minute

I. EINLEITUNG

In einem Zeitraum von mehr als 35 Jahren sind über 4000 Antibiotika beschrieben worden, von denen jedoch nur 90 kommerziell hergestellt werden. 46 Produktionsverfahren stellen eine Kombination von mikrobieller Synthese und chemischer Modifikation dar. Nur zwei, nämlich Chloramphenicol und Pyrollnitrin, werden chemisch synthetisiert, die restlichen entstammen reinen Fermentationsprozessen (Perlman, 1979).

Trotz dieser Vielfalt der schon beschriebenen Antibiotika sind immer noch nicht alle für einen Einsatz in Frage kommenden Felder ausreichend mit gut wirkenden, nichttoxischen und die Umwelt wenig belastenden Antibiotika abgedeckt (Zähner, 1978). Zu diesen Bereichen gehört auch der Pflanzenschutz. Immer noch reduzieren Schädlinge, Pflanzenkrankheiten und Unkräuter die potentielle Welternte jährlich um ein Drittel (Bauer et al., 1981). Neben Kulturmaßnahmen und Resistenzzüchtung ist der chemische Pflanzenschutz ein wesentlicher Faktor bei der Bekämpfung dieser hohen Verluste. Die Möglichkeiten des chemischen Pflanzenschutzes werden ergänzt durch die Anwendung wirksamer Naturstoffe, die aus Mikroorganismen isoliert werden. Die Fülle der biosynthetischen Leistungsmöglichkeiten des Sekundärstoffwechsels liefert immer noch interessante Strukturen, welche mit Hilfe der Synthesechemie wegen der Komplexizität dieser Verbindungen nicht oder nur schwer erbracht werden können. Ein weiterer Vorteil mikrobieller Metabolite kann in der meist guten Abbaubarkeit gesehen werden, so daß das Rückstandsproblem weniger kritisch ist.

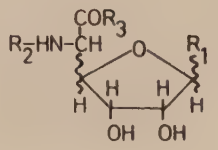
Um ein mikrobielles Pflanzenschutzpräparat wirtschaftlich herstellen zu können, sind Fermentationsausbeuten von über 10 g/l notwendig. In modernen industriellen Prozessen machen die Produkte bis zu 30 % der eingesetzten Nährstoffe aus, so daß der früher eher nebensächliche Stoffwechselweg

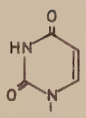
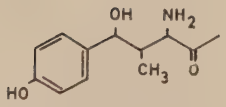
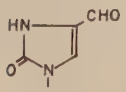
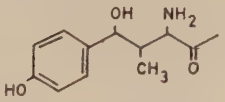
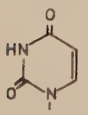
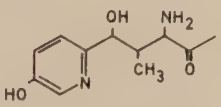
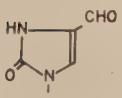
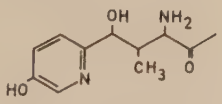
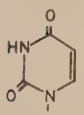
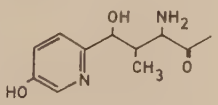
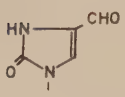
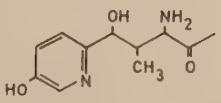
zum sekundären Metaboliten einen Großteil der Stoffwechselaktivität des Hochleistungsstammes vereinnahmt. Dieses Produktionsziel kann nur in einer interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Mikrobiologie, Chemie, Biochemie, Genetik und Biotechnologie erreicht werden.

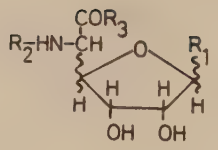
In einem "nicht klassischen" Antibiotika-Screening wurde aus einer Bodenprobe von Nikko, Japan, ein Actinomycetales Stamm Tü 901 isoliert, dessen biologische Aktivität an der Riesenkolonie von Botrytis cinerea ein abnormes Hyphenwachstum verursachte (Höhne, 1974). Dieser sogenannte "bulging effect" wird hervorgerufen durch eine Hemmung der Chitinsynthese in der Zellwand. Die chemische Charakterisierung zeigte, daß es sich um ein Nukleosidpeptid-Antibiotikum handelte (Dähn et al., 1976). Dieses antifungische Antibiotikum erhielt den Namen Nikkomycin. In der Folgezeit wurde eine Reihe verschiedener Nikkomycine aus dem Kulturfiltrat des Stammes Tü 901 isoliert (Dehler, 1979). Abbildung 1 zeigt die Struktur aller bisher bekannten Nikkomycine. Allen biologisch aktiven Nikkomycinen gemeinsam ist eine Aminouronsäure, an die entweder die Base Uracil oder 4-Formyl-4-imidazolin-2-on N-glycosidisch gebunden ist und eine ungewöhnliche pyridinhaltige L-Aminosäure (2-Amino-4-hydroxy-4-(5-hydroxy-2-pyridyl)-3-methylbuttersäure), welche peptidisch mit dem Nucleosid verknüpft ist. Die Nikkomycine I und J sind analoge Verbindungen zu Z und X, die jedoch zusätzlich über die freie Carboxylgruppe der Aminouronsäure peptidisch mit L-Glutamat verbunden sind. Die biologisch inaktiven Nikkomycine C, D, M und N können als Hydrolyseprodukte der aktiven Nikkomycine Z, X, I und J angesehen werden. Die Konfiguration der pyridinhaltigen L-Aminosäure ist 2S, 3S, 4S (König et al., 1980). Voraussichtlich ist das Nucleosid C_X ein α-Glykosid der Talose, während das Nucleosid C_Z ein β-Glykosid der Allose zu sein scheint (König, 1980).

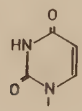
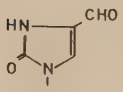
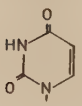
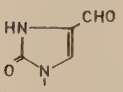
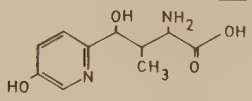
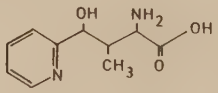
Ebenfalls wie die von den Japanern beschriebenen Polyoxine (Review: Isono and Suzuki, 1979) hemmen die biologisch ak-

Abb. 1: Strukturformeln der Nikkomycine

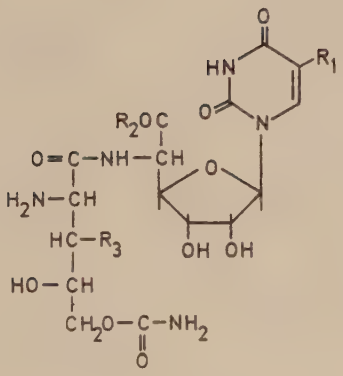


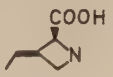
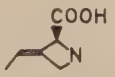
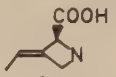
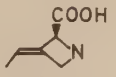
NIKKOMYCIN	R_1	R_2	R_3
B			OH
B_x			OH
Z			OH
X			OH
J			Glu
I			Glu

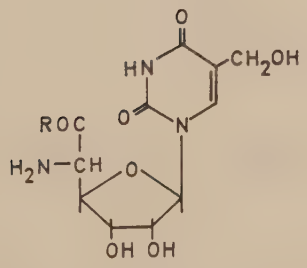


NIKKOMYCIN	R_1	R_2	R_3
N		H	Glu
M		H	Glu
C_z		H	OH
C_x		H	OH
D			
E			

tiven Nikkomycine den Einbau von N-Acetyl-Glucosamin ins Chitin (Höhne, 1974; Brillinger, 1979; Müller, 1981). In Abbildung 2 sind die Strukturen der Polyoxine dargestellt. Die biologisch aktiven Polyoxine haben mit den Nikkomycinen die Struktur der Aminouronsäure gemeinsam. Als N-glykosidisch gebundene Base tritt Uracil bzw. modifiziertes Uracil auf. An die Carboxylgruppe der Aminouronsäure kann



Polyoxin	R_1	R_2	R_3
A	CH_2OH		OH
B	CH_2OH	OH	OH
D	COOH	OH	OH
E	COOH	OH	H
F	COOH		OH
G	CH_2OH	OH	H
H	CH_3		OH
J	CH_3	OH	OH
K	H		OH
L	H	OH	OH
M	H	OH	H



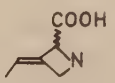
	R
C	OH
I	

Abb. 2: Strukturformeln der Polyoxine

eine Polyoximsäure gebunden sein. An die Aminogruppe ist peptidisch eine Carbamoylpolyoxamsäure geknüpft.

In neuerer Zeit wurden von den Japanern die Neopolyoxine beschrieben, die mit den Nikkomycinen eng verwandt, eventuell identisch sein könnten (Kobinata et al., 1980).

Über die Biosynthese der Nikkomycine herrscht noch Unklarheit. Man kann jedoch davon ausgehen, daß die Biosynthese der Aminouronsäure wie beim Polyoxin C abläuft (s. Abbildung 3). Isono et al. (1978) konnten zeigen, daß als direkte Vorstufen Uridin und Phosphoenolpyruvat verwendet werden.

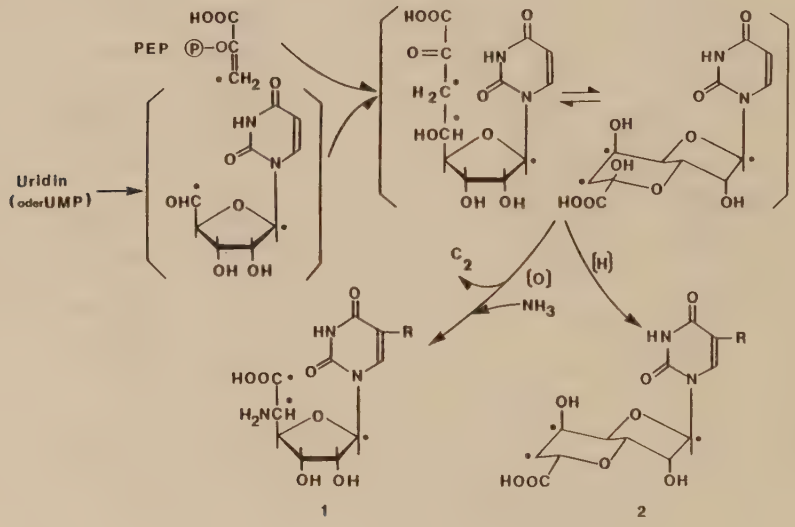
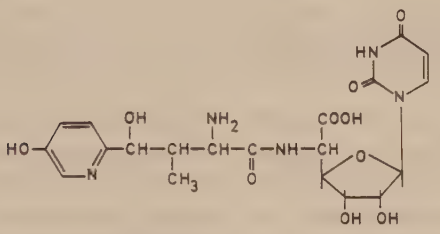


Abb. 3: Biosynthese des Nukleosid-Gerüstes der Polyoxine.
1. Polyoxin C
2. Octosylsäure

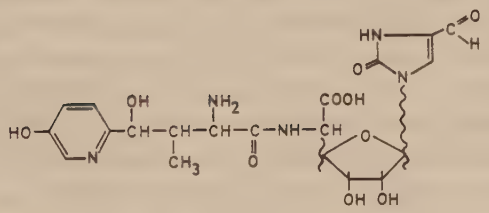
Die biologische Wirkung der Nikkomycine beruht auf der kompetitiven Verdrängung des UDP-N-Acetyl-glucosamins von der

Chitinsynthetase. Abbildung 4 zeigt die strukturelle Ähnlichkeit von Nikkomycin Z, X und UDP-N-Acetyl-glucosamin.

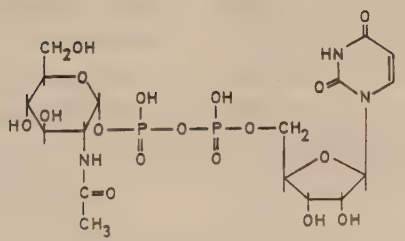
Neben der antifungischen Wirkung gegen zum Teil phytopathogene Pilze wurde bei einem Nikkomycin Z,X Gemisch eine



Nikkomycin Z



Nikkomycin X



UDP-GlcNAc

Abb. 4: Strukturformeln von Nikkomycin Z, X und UDP-N-Acetyl-glucosamin (UDP-GlcNAc).

gute akarizide Wirkung gefunden. Nikkomycin Z/X wirkt nur auf sich entwickelnde Tiere, selbst bei hohen Dosierungen konnte keine akute ovizide und adultizide Wirkung beobachtet werden. Die Entwicklung beweglicher Stadien wurde bei nur 0,004 % Wirkstoff stark verzögert und brach im jeweils folgenden Chrysalisstadium abrupt ab. Nikkomycin verhindert das Schlüpfen von Nymphen aus allen Chrysalisstadien (Zoebelein, 1979).

Untersuchungen an Insekten-Chitinsynthetase bestätigten die ausgezeichnete Wirkung der Nikkomycine im Vergleich zu anderen Hemmstoffen (Cohen and Casida, 1980). Die Toxizität gegenüber Säugetieren ist aufgrund des spezifischen Wirkungsmechanismus niedrig. Die LD_{50} (oral) liegt bei der Ratte über 5000 mg/kg. Nach Laborversuchen ist der Wirkstoff nicht bienentoxisch. Im rheinischen Obstbaugebiet wurden in dreijährigen Freilandversuchen mit Nikkomycin gute Ergebnisse gegen Spinnmilben (Panonychus ulmi) erzielt (Zoebelein, 1980). Bei allen bisherigen antifungischen und akariziden Testierungen war das Nikkomycin Z,X Gemisch biologisch aktiver als ein Nikkomycin I,J Gemisch (Dehler, 1979; Müller, 1981; Zoebelein, 1981).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchungen am Wildstamm Tü 901 Auskunft über Steigerungsmöglichkeiten der Nikkomycinausbeute zu erhalten.

Diese Ergebnisse sollten dann in einen biotechnologischen Prozeß übertragen werden und gleichzeitig Ansatzpunkte für eine gezielte genetische Bearbeitung des Stammes aufzeigen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Sofern nicht besonders aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Brenntag, Mühlheim/Ruhr	Niax - Polyol LHT 67
Boehringer, Mannheim	Stärke, UV-Test
Deutsche Ajinomoto GmbH, Hamburg	L-Asparagin-Monohydrat
Deutsche Maizenawerke, Hamburg	Cerelose (D-Glucose), Mannit, Stärke
Deutsche Pharmacia, Frankfurt	SP-Sephadex C-25
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto Agar
Hedinger, Stuttgart	Hyphlo Supercel (Celit)
Oxoid Deutschland, Wesel	Malt Extract Yeast Extract
Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, USA	L-Valinol·HCl L-Leucinol·HCl L-Valinamid·HBr
Promochem, Wesel	MES, MOPS, TES
Fluka AG, Buchs, Schweiz	Tween 80 2-Hydroxyisobutyrat L-Isoleucinmethylester·HCl 2-Hydroxyisovaleriat
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	Dowex 50 WX 4 α-Aminoisobutyrat DL-Norvalin N-Methyl-L-valin L-Isoleucinamid
Schoenenberger, Magstadt	Sojamehl

Sigma Chemical Company St. Louis, USA	8-Methoxypsoralen L-Isoleucinhydroxamat L-Norvalin L-allo-Isoleucin D-Isoleucin DL-C-Allylglycin
Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Biogel P 2 (200-400 mesh)
Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen	Diagnostica Test: anorganischer Phosphor
Amersham Buchler, Braunschweig	L-[U-^{14}C]Isoleucin (10 mCi/mmol, 76,3 µCi/mg) L-[U-^{14}C]Leucin (10 mCi/mmol, 76 µCi/mg) L-[U-^{14}C]Valin (10 mCi/mmol, 85,5 µCi/mg)

2. Mikroorganismen

Bakterien		Temperatur
Bacillus brevis Migula ATCC 9999		37°
Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn Tü 203		37°
Escherichia coli (Migula) Castellani & Chalmers K12		37°
Sarcina lutea		37°
Pilze		
Absidia spinosa Lendner	Tü 268	27°
Alternaria kikuchiana Tanaka	Tü 169	27°
Ascoidea rubescens	Tü 195	27°
Ascosphaera apis	Tü 554	27°
Aspergillus flavus	Tü 135	27°
Aspergillus fumigatus Fresenius	Tü 149	37°
Botrytis cinerea Persoon ex Fries	Tü 157	27°
Candida albicans (Robin) Berkhout	Tü 164	37°
Candida pulcherrima		37°

		Temperatur
Colletotrichum acutaxum	CBS 979.69	27°
Colletotrichum coccodes	CBS 126.57	27°
Colletotrichum graminicola	DSM 63.127	27°
Coprinus cinereus Gray		RT
Corticium sasakii	DSM 62716	27°
Curvularia spec.	Tü 627	27°
Debaryomyces hansenii	DSM 70238	27°
Drechslera oryzae (van Breda de Haan) Subram & Jain	CBS 119.24	RT
Formitropsis marginatus		24°
Fusarium spec.	Tü 638	27°
Geotrichum candidum	CBS 109.12	24°
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart et Grigorakis	Tü 282	27°
Mucor hiemalis (+) Wehmer	Tü 179	RT
Mucor hiemalis (-) Wehmer	Tü 180	RT
Mucor mucedo (+)	Tü 181	27°
Mucor mucedo (-)	Tü 182	27°
Mucor racemosus	DSM 62760	27°
Paecilomyces variotii Bainier	Tü 137	37°
Rhodotorula rubra		24°
Saccharomyces cerevisiae Hansen	Tü 125	27°
Saprolegnia asterophera de Bary	CBS 180.44	24°
Schizophyllum commune		27°
Schizophyllum pombe Lindner	Tü 251	27°
Sordaria macrospora Auerswald	Tü 128	27°
Torulopsis spec.		27°
Trametes zonata		24°
Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard	Tü 510	27°
Venturia inaequalis		RT

3. Nährmedien

a) Medien für Schrägröhrchen, Testplatten, Penicillin-Flaschen

Medium 1

4 g Glucose
10 g Malzextrakt
4 g Hefeextrakt
20 g Agar
1 l Leitungswasser
pH 7,3

Medium 2

10 g Glucose
0,5 g Asparagin
0,5 g $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,5 g NaCl
0,2 g $CaCO_3$
20 g Agar
1 l Leitungswasser
pH 7,3

b) Medien für die Nikkomycin-Produktion

Medium 3

30 g Stärke
0,3 g Harnstoff

Die Spurenelemente wurden bei Kolbenversuchen in zwei Lösungen getrennt angesetzt und in die einzelnen Kolben pipettiert. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf die Endkonzentration im Medium (g/l).

Lösung A:

1 g $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
1 g NaCl
0,02 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
0,01 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Lösung B:

0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

Es wurde destilliertes Wasser verwendet. Der pH wurde auf 6,15 eingestellt. Die Kolbenversuche wurden in Gegenwart von MES (50 mM) durchgeführt.

Medium 4 (Dehler, 1979)

1 % Stärke
3 % Mannit
2 % Hefeextrakt
2 % Sojamehl

pH 6,0

c) resting-cell Medium

1 % Mannit
0,05 % Asparagin
50 mM MES
100 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
20 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
10 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
100 mg KCl
5 mg $CuSO_4 \cdot 7H_2O$
100 mg $CaCl_2$
9 g NaCl
ad 1 l destilliertes Wasser

pH 6.0

d) feeding-Lösungen (ad 2 l Leitungswasser)

feeding-Lösung A

900 g Cerelose
30,4 g NH_4NO_3

feeding-Lösung B

900 g Cerelose
30,4 g NH_4NO_3
100 g L-Leucin bzw.
100 g L-Isoleucin

feeding-Lösung C

900 g Cerelose
30,4 g NH_4NO_3
100 g L-Leucin
9,34g K_2HPO_4

L-Leucin bzw. L-Isoleucin wurden jeweils mit verdünnter H_2SO_4 vor dem Autoklavieren in Lösung gebracht.

4. Kulturbedingungen Tü 901

4.1. Schrägröhrchen und Platten

Der Stamm wurde auf Schrägröhrchen mit Medium 1 überimpft, bis zur Sporulation bei 27°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Platten mit Medium 1 wurden zum Isolieren von Einzelkolonien verwendet.

4.2. Anzucht von Kulturen zur Gewinnung von Sporen

Ein Schüttelkolben mit Medium 4 wurde vom Schrägröhrchen beimpft und 48 Stunden bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Mit 30 ml dieser Kultur wurden Penicillin-Flaschen bzw. Fernbachkolben, die 300 ml bzw. 200 ml Medium 1 enthielten, beimpft.

Nach 10-tägiger Inkubation bei 27°C war der Nährboden gleichmäßig mit Streptomyces tendae überwachsen. Die Sporen wurden mit tweenhaltiger Saline (1 Tropfen auf 100 ml Saline) und Glasperlen vom Myzel abgelöst. Die Sporenketten wurden im Ultraschallbad zerschlagen. Anschließend wurde die Suspension über einen Filter aus Glaswolle gegeben. Der Durchlauf mit den Einzelsporen wurde mit Saline auf eine OD_{578} von 0.7 eingestellt und bei -20°C eingefroren.

4.3. Schüttelkolbenversuche

Die Untersuchungen zur Nikkomycinproduktion wurden in 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit einem seitlichen Einstich (Schikane) durchgeführt. Die Füllung der Kolben betrug 100 ml. Alle Kolbenversuche wurden auf einer rotierenden

Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 rpm mit einem Auslenkradius von 25 mm bei 27°C inkubiert. Der pH-Wert wurde, soweit nicht anders angegeben, vor dem Sterilisieren mit 3 N NaOH bzw. 3 N H_2SO_4 auf 6,15 eingestellt. Nach der Sterilisation wurden die Kolben mit 2 ml Sporensuspension bzw. vom Schrägröhrchen angeimpft.

4.4. resting-cell Versuche

Die Kulturen aus 10 Erlenmeyerkolben (500 ml, 1 Schikane, Medium 4, 72 Stunden alt) wurden vereinigt, abzentrifugiert und das Sediment zweimal mit kalter Saline gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Sediment resuspendiert und mit Saline auf ein Volumen von 600 ml aufgefüllt.

500 ml Erlenmeyerkolben mit 1 Schikane und 80 ml resting-cell Medium wurden mit 20 ml der Suspension beschickt und anschließend, wie in Abschnitt 4.3. angegeben, inkubiert.

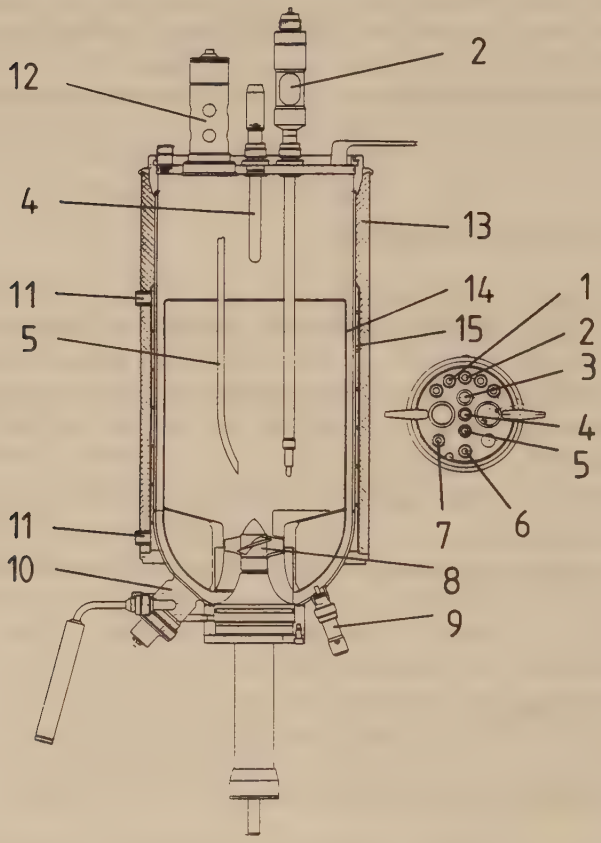
4.5. Fermentation (20 l)

4.5.1. batch-Fermentation

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Fermentationen erfolgten in 20 l Fermentern mit Umwurfsystem (Typ b20, AG für biologische Verfahrenstechnik, Fabrikation und Verkauf in Lizenz Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz). Die Schnittzeichnung eines solchen Fermenters ist in Abbildung 5 zu sehen.

Der Fermenter wurde zusammen mit 19 l Nährlösung in situ 30 Minuten bei 121°C sterilisiert. Vor der Sterilisation war der pH der Nährlösung mit verdünnter H_2SO_4 auf 6.0 ein-

Abb. 5: 20 l Fermenter der Giovanola Frères S.A., Monthey/ Schweiz, System "Intensor".



1	Thermometer	9	Temperaturfühler
2	pH-Elektrode	10	Probenahme-Ventil
3	Sauerstoffelektrode	11	Anschlüsse für Temperatur-kreislauf
4	Antischaumsonde	12	Lampe
5	Belüftungsrohr	13	Isolationsmantel
6	Säurezugabe	14	Leitkörper
7	Laugezugabe	15	Doppelmantel
8	Propeller		

gestellt worden. Die Zugabe von 3 ml Niax-Polyol als Antischaummittel erfolgte ebenfalls vor der Sterilisation. Nach dem Abkühlen wurden folgende Fermentationsparameter eingeregelt:

Remperatur	:	27°C
Belüftung	:	0,5 vvm
Propellerdrehzahl	:	1200 rpm
pH	:	6,0 ± 0,05

3 N H_2SO_4 und 3 N NaOH wurden als Vorlage für die pH-Regelung steril angeschlossen.

Technische Details der Anlage sind in einer Dissertation beschrieben (Hasenböhler, 1978).

Der Fermenter wurde mit 1 l einer 24 bis 30 Stunden alten Schüttelkolbenkultur angeimpft.

4.5.2. pO_2-feeding-Fermentation

Die pO_2-feeding-Fermentationen wurden auf der gleichen Anlage unter den Bedingungen wie in Abschnitt II.4.5.1. beschrieben durchgeführt. Als Vorlage für die feeding-Lösung diente ein 2,4 l Gefäß, welches extern im Autoklav sterilisiert wurde.

5. Kulturbedingungen von Testorganismen

5.1. Herstellung von Testplatten mit Bakterien und hefeartig wachsenden Pilzen

Die Testkeime wurden 16 - 20 Stunden in Schüttelkultur auf Nährmedium 1 (ohne Agar) bis zu einer OD_{578} von 1,3 angezogen. 1 ml dieser Kultur wurde zu 100 ml flüssigem Agar (Medium 1) pipettiert. Die zu 17,5 ml Portionen gegossenen Platten konnten einige Tage im Kühlschrank bei 4°C aufgehoben werden.

5.2. Herstellung von Testplatten mit Mucor hiemalis Tü 179 und Tü 180

Die Stämme Tü 179 und Tü 180 wurden getrennt auf Medium 1 in Standkulturen angezogen. Nach ungefähr 10 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Sporen mit tweenhaltiger (1 Tropfen auf 100 ml) Saline geerntet werden. Die Sporensuspensionen beider Stämme wurden auf eine OD_{578} von 0,4 - 0,5 eingestellt. Je 5 ml beider Sporensuspensionen wurden in einem Reagensglas eingefroren. Bei Bedarf wurden je 10 ml Sporensuspension zu 200 ml Agar (Medium 1) gegeben. Die Platten konnten maximal 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt werden.

6. Meß- und Regelvorgänge am 20 l Fermenter

6.1. pH-Messung und Regelung

Der pH wurde kontinuierlich in situ mit einer sterilisierbaren Elektrode der Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz, Typ 465-VT, gemessen.

Zur pH-Regelung wurde ein Regler der Firma Paratronic, Typ A 931, verwendet.

6.2. pO_2-Messung und Regelung

Der Sauerstoffpartialdruck in Submerskultur wurde kontinuierlich mit einer sterilisierbaren Sauerstoffelektrode (Modell IL 531) der Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz, gemessen.

Die pO_2-Reglung erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Reglers Typ A 931 von Paratronic.

6.3. Bestimmung des Luftvolumens

Die Luftmenge, die während der Fermentation den Fermenter durchströmt, wurde mit einem Laborgasmeter, Typ L5-PVC, der Firma Wohlgroth, Zürich, Schweiz, ermittelt.

7. Untersuchungen der Fermentationsproben

7.1. Myzeltrockengewicht

Sofort nach der Probenahme wurden 5 ml der Kultur mit Hilfe einer abgesägten 10 ml Pipette auf einen Filter transferiert und abgenutscht. Die Filter (MN 615, Ø 4,5 cm, Macherey und Nagel, Düren) waren vorher bei 100°C im Trokkenschrank getrocknet und nach 60 Minuten Temperaturausgleich bei Raumtemperatur gewogen worden. Nach dem Abnutschen des Myzels wurden die Filter über Nacht getrocknet und erneut 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Myzelgewicht ergab sich aus der Differenz der beiden Messungen.

7.2. Nikkomycinbestimmung

7.2.1. Plattendiffusionstest

Der Test wurde nach Zähner & Mass (1972) in Petrischalen der Firma Greiner, Nürtingen mit Filterrondellen von 6 mm Ø (Machery & Nagel, Düren) durchgeführt.

Der Test diente zur groben Untersuchung der Nikkomycin-Produktion. Er gibt keine differenzierte Auskunft über den Anteil der verschiedenen Nikkomycine. Alle biologisch gegen Mucor hiemalis aktiven Verbindungen werden erfaßt.

Die Filterrondellen wurden mit je 10 µl Kulturfiltrat beschickt, auf einer Glasplatte bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend auf die Testplatte mit Mucor hiemalis Sporen (Tü 179 + Tü 180), siehe Abschnitt 5.2., gelegt. Die Testplatten wurden bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach ungefähr 12 Stunden konnte die Wachstumshemmung, nach weiteren 36 Stunden die Zygosporenhemmung

ausgewertet werden. Anhand einer parallel aufgenommenen Eichkurve konnte die Gesamtaktivität bestimmt werden.

7.2.2. HPLC

Mit Hilfe der HPLC war es möglich, die Nikkomycine C, D, Z, X einzeln, sowie I, J summarisch, qualitativ und quantitativ in einem Lauf zu erfassen. Das Kulturfiltrat der Fermentationsproben konnte, nach einem weiteren Filtrationsschritt, direkt analysiert werden. Die genauen Details dieser Methode sind von Fiedler (1981) veröffentlicht.

7.3. Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung wurde mit einem Reagentiensatz der Firma Roche Diagnostica durchgeführt.

7.4. Stärkebestimmung

Die Bestimmung der Reststärke wurde mit einem Reagentiensatz der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt.

7.5. Mannitbestimmung

Die Reaktion besteht aus der Umsetzung von Polyalkoholen mit Perjodat. Bei der Reaktion entsteht Formaldehyd, der mittels Chromotropsäurereaktion bestimmt wird (Auterhoff und Lohmann, 1957). Der genaue Testansatz ist in der Arbeit von Dehler (1979) beschrieben.

7.6. Stickstoffbestimmung

Die Gesamtstickstoffbestimmung wurde nach der Micro-Kjeldahl-Methode durchgeführt.

7.7. Viskositätsmessung

Die Bestimmung der Viskosität erfolgte direkt nach dem Ziehen der Fermentationsproben mit einem Viskosimeter der Firma Haake, Typ Rotovisco RV3, mit der Meßeinrichtung MVI, bei Raumtemperatur und bei einer Drehzahl von 128 Umdrehungen pro Minute.

8. Mutagenese

Die Mutagenese wurde nach der Methode von Townsend et al. (1974) mit 8-Methoxypsoralen und UV-Licht durchgeführt.

4,5 ml Sporensuspension von Tü 901 mit einer OD_{578} von 0,5 wurden mit 0,5 ml 8-Methoxypsoralen-Lösung (1 mg 8-Methoxypsoralen/ml Äthanol p.A.) bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Sporen unter einer UV-Lampe bestrahlt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Sporen entnommen, gewaschen, verdünnt und auf Platten mit definiertem und komplexem Medium ausgestrichen.

9. Aminosäurepoolbestimmung

Der Stamm Tü 901/8c wurde in Schüttelkultur auf Medium 4 angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden steril mit einer aufgesägten Pipette 6 ml Kultur entnommen und sofort im Eisbad gekühlt.

9.1. Zellaufschluß

Die Proben wurden abzentrifugiert, zweimal mit kalter Saline gewaschen, anschließend beschallt (Branson Sonic Power, 8 mal 15 Sekunden, Stufe 4) und die Zelltrümmer bei 25.000 g 30 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde bei -20°C bis zur Aminosäureanalyse aufbewahrt.

9.2. Aminosäureanalyse

Nach dem Auftauen des Überstands wurden die Proben zentrifugiert, um ausgefallene Niederschläge zu sedimentieren. Je 1 ml des Überstands wurde zur Fällung löslicher Proteine mit 4 ml 3 %iger Sulfosalicylsäure gemischt und 30 Minuten inkubiert (Handbuch zu Aminosäureanalysator von Biotronik). Der Auftretende Niederschlag wurde abzentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden mit Elutionspuffer pH 2,2 auf 5 ml aufgefüllt. Mit je 200 µl dieser Verdünnung wurde der Aminosäureanalysator beschickt (Aminosäureanalysator Chromatographie System LC 6000 E, Biotronik).

10. ^{14}C-Einbauversuch

Der Einbauversuch mit [U-^{14}C]Isoleucin, [U-^{14}C]Leucin und [U-^{14}C]Valin wurde in 100 ml Erlenmeyerkölbchen mit einer Schikane und 10 ml Kulturvolumen unter resting-cell Bedingungen (s. Abschnitt II.4.4.) durchgeführt.

Die Kölbchen waren mit jeweils 10 mMol pro Liter der entsprechend unmarkierten Aminosäure supplementiert.

Nach dem Transfer der Biomasse wurden jeweils 25 µCi ^{14}C Aminosäure in 500 µl 0,2 %igem Äthanol hinzupipettiert. Zu diversen Zeiten wurden Proben entnommen, die Biomasse

abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren. Das Kulturfiltrat wurde später dünnschichtchromatographisch (s. Abschnitt II.12.) untersucht. Nach der Entwicklung wurde das Chromatogramm nach flächenweisem Auskratzen (0,5 cm x 1,0 cm) im Liquid-Scintillation-Counter auf Radioaktivität gescannt.

11. Isolierung und Charakterisierung von Nikkomycin Z

11.1. Aufarbeitung von Nikkomycin Z

Die Isolierung erfolgte im wesentlichen nach der von Dehler (1979) beschriebenen Methode. Auf Grund des erhöhten Wirkstoffgehalts konnte die Isolierung jedoch vereinfacht werden.

Die Kultur (15 l) wurde nach Zusatz von 2 % Celit mit einer Mehrschichtenfilterpresse über die Filterschicht C150 (Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) geklärt, mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt und im Kühlraum bei 4°C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt. Ein leichter Niederschlag konnte über einen Faltenfilter beseitigt werden. Das Kulturfiltrat wurde anschließend auf eine Dowex 50WX4 (50-100 mesh Na^+ Form) Säule (Bettvolumen 2 l) aufgetragen und so lange mit entionisiertem Wasser gewaschen, bis der Säulenauslauf farblos war. Danach wurde mit 0,05 N NH_3-Lösung eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer vom NH_3 befreit und auf ein Volumen von 1 l eingeengt. Gegebenenfalls wurde der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt. Das Konzentrat wurde direkt auf eine SP-Sephadex C-25 Säule (Pyridinium-Form, Bettvolumen 1 l, Fließgeschwindigkeit 30 ml/Stunde) aufgetragen. Die weitere Elution an SP-Sephadex C-25 und die anschließende Biogel-P2-Gelchromatographie (200-400 mesh) erfolgte wie bei Dehler (1979) beschrieben.

11.2. UV-Spektrum

Das Absorptionsspektrum von Nikkomycin Z wurde mit einem Spektralphotometer DB-GT der Firma Beckman, Münster, aufgenommen. Die Substanz wurde hierfür in O,1 N NaOH bzw. HCl gelöst. Die Messung wurde in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

11.3. IR-Spektrum

Das IR-Spektrum wurde mit einem Perkin-Elmer Spektrograph, Modell 137, in Kaliumbromid aufgenommen.

11.4. Bestimmung des Wirkungsspektrums im Vergleich mit Nikkomycin X

Die Ermittlung der MHK-Werte erfolgte bei Bakterien und hefeartig wachsenden Pilzen im Plattendiffusionstest (s. Abschnitt II.7.2.1.); bei allen anderen Pilzen an der Riesenkolonie (Hütter et al., 1965). Mit einem Korkbohrer von 6 mm Ø wurden Myzelstücke ausgestochen und auf Testplatten gelegt. Hatten die Kolonien einen Durchmesser von 25 mm erreicht, wurden die Filterrondellen in einem Abstand von 1 mm zum Wachstumsrand der Kolonie entfernt aufgelegt. Nach 24 Stunden Inkubation konnte die Hemmung abgelesen und eventuelle morphologische Veränderungen unter dem Mikroskop beobachtet werden.

12. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden fertige Cellulose-DC-Glasplatten der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.

Die Chromatographie der Nikkomycine bzw. des Nikkomycin-haltigen resting-cell Kulturfiltrats erfolgte aufsteigend in einem Fließmittelsystem der folgenden Zusammensetzung:

Äthanol : Eisessig : Wasser 4:1:1

Der Nachweis der Nikkomycine wurde durch Besprühen mit Ninhydrin und durch optische Auswertung unter der UV-Lampe erbracht.

III. ERGEBNISSE

1. Klonierung des Stammes Tü 901

Zu Beginn der Arbeit wurde der Stamm Tü 901 Streptomyces tendae Ettlinger kloniert.

Zu diesem Zweck wurde eine Mutagenese nach der Methode Townsend et al. (1971) mit UV-Licht in Gegenwart von 8-Methoxypsoralen durchgeführt. In Abbildung 6 ist die Überlebenskurve dargestellt. Da Townsend et al. für ein Mutationsprogramm eine Überlebensrate von ungefähr 1 - 3 % emp-

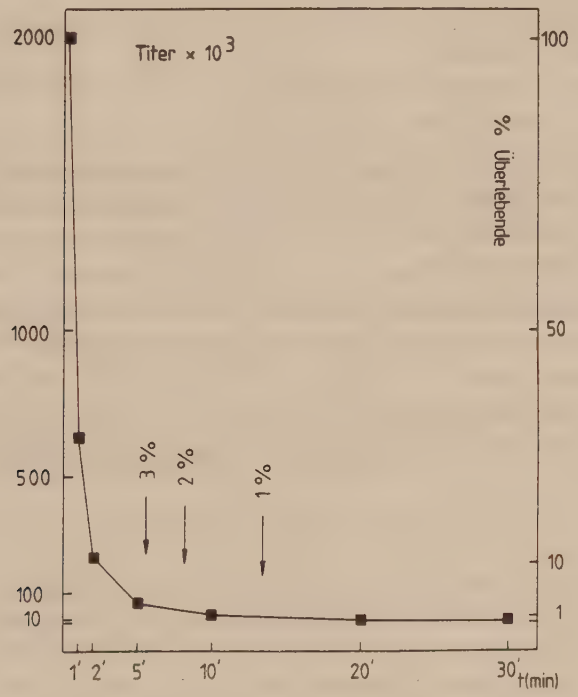


Abb. 6: Überlebenskurve von Tü 901 während der Bestrahlung mit UV-Licht in Gegenwart von 8-Methoxypsoralen.

fehlen, wurden die Sporen von Tü 901 nach einer UV-Einwirkzeit von 10 Minuten gewaschen, kloniert und getestet.

Nach Hopwood und Merrick (1977) sind bei Streptomyceten die meisten auxotrophen Mutanten schlechtere Antibiotikaproduzenten als der Wildtyp. Aus diesem Grund wurden nur solche Klone auf Nikkomycinproduktion getestet, die keine Auxotrophie zeigten. Klone mit sichtbaren morphologischen Veränderungen wurden ebenfalls getestet, um eventuell eine Korrelation zwischen Nikkomycinbildung und Phänotyp zu finden.

Folgende Phänotypen wurden auf Platten mit Medium 1 beobachtet:

1. kein Luftmyzel, keine Sporen
2. schwaches Luftmyzel am Rand der Kolonie, keine Sporen
3. weißes Luftmyzel
4. samtgraue Kolonie
5. Kolonie grau, stark sporulierend

Nach dem Test auf Nikkomycinbildung in Submerskultur konnte keine Korrelation zwischen Nikkomycinproduktion und Phänotyp gefunden werden. In allen Gruppen gab es gute und schlechte Produzenten.

Für alle weiteren Untersuchungen wurde ein stark sporulierender Stamm ausgewählt, der die Laborbezeichnung Tü 901/8c erhielt.

Auf dem Produktionsmedium 4 bildete der Stamm Tü 901/8c in Schüttelkultur die in Tabelle 1 angegebenen Nikkomycinmengen.

Tabelle 1: Nikkomycinproduktion des Stammes Tü 901/8c nach 120 Stunden in Schüttelkultur. Als Medium wurde das komplexe Medium 4 verwendet. Die Daten wurden mit Hilfe der HPLC aus 3 Parallelansätzen ermittelt.

	mg/l
Nikkomycin C	347
Nikkomycin D	150
Nikkomycin Z	63
Nikkomycin X	796
Nikkomycin I, J	170

2. Suche nach einem definierten Medium

Komplexe Nährmedien haben zahlreiche Nachteile. Sie enthalten meist unlösliche Bestandteile, die bei der Bestimmung der Biomasse zu erheblichen Fehlern führen. Ihre Zusammensetzung kann je nach gelieferter Charge schwanken, und somit können Änderungen im Fermentationsverlauf auftreten, deren Ursachen schwer zu analysieren sind. Der Vorteil eines definierten Mediums liegt in der erleichterten Analyse und der erhöhten Reproduzierbarkeit der Versuche. Leider sind in den meisten Fällen die Antibiotikaproduktbildungsgeschwindigkeiten auf definierten Medien erheblich niedriger als auf komplexen Medien.

Dennoch wurde der Versuch unternommen, für den Nikkomycin-Produzenten Tü 901 ein definiertes Medium zu finden. Die Nikkomycinbildung wurde im Schüttelkolben auf verschiedenen definierten C- und N-Quellen bei gleichzeitiger Konstanz der Spurenelemente getestet. Die Kolben wurden mit Sporen von Tü 901, wie im Methodenteil beschrieben, angeimpft. Da die Sporen nicht aktiviert waren, dauerte die Auskeimung 2 - 3 Tage (Grund and Ensign, 1978). Nach 140

bzw. 250 Stunden wurde die Nikkomycinproduktion mit Hilfe des Plattendiffusionstestes und Mucor hiemalis als Testorganismus bestimmt. Das Ergebnis nach 250 Stunden Inkubation ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Nikkomycinbildung nach 250 Stunden Inkubation auf verschiedenen C-Quellen bei gleichzeitiger Variation der N-Quelle.
A = NH_4NO_3 B = $(NH_4)_2SO_4$ C = Harnstoff

C-Quelle	N-Quelle	Wachstum	biol. Aktivität (mm Zygosporenhemmung)
Glucose	A	+++	25
	B	+	0
	C	+++	35
Stärke	A	+	Spur
	B	+	20
	C	+++	48
Lactose	A	+	0
	B	++	0
	C	+	0
Mannose	A	+	0
	B	+	15
	C	+	0
Saccharose	A	+	0
	B	+	0
	C	+	0

Schüttelkolbenversuch: C-Quelle je 3 g/100 ml; N-Quelle je 0,3 g/100 ml; bei dem Versuch wurde die Spurenelementlösung aus Medium 3 verwendet; Bewertung des Wachstums mit "+" bei mäßigem Wachstum bis "+++" bei gutem Wachstum.

Auf Glucose war die Nikkomycinproduktion mäßig, auf Stärke relativ gut. Alle anderen C-Quellen sind nicht geeignet.

Sowohl bei Glucose als auch bei Stärke wurden mit Harnstoff als N-Quelle die besten Ergebnisse erzielt.

3. batch-Fermentation auf definiertem Medium

Zur genaueren Untersuchung der Nikkomycinbildung wurde auf dem in Abschnitt III.2. optimierten Medium 3 eine Fermentation unter pH-statischen Bedingungen im 20 l Umwurffermenter durchgeführt.

Die Analyse der Fermentation ist in Abbildung 7 dargestellt.

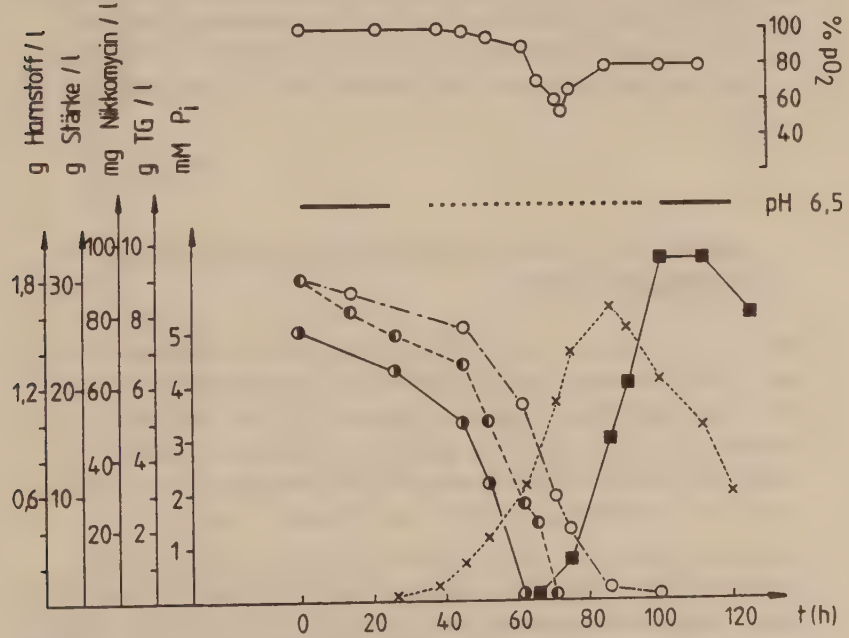


Abb. 7: batch-Fermentation auf definiertem Medium im 20 l Fermenter unter pH-statischen Bedingungen (pH 6,5). O—O pO_2 %; ▬ Säure-Verbrauch (3 N H_2SO_4); ···· Lauge-Verbrauch (3 N NaOH); ■—■ Nikkomycin (mg/l); ×---× TG (g/l); O--O Stärke (g/l); ◐--◐ Harnstoff (g/l); ◑—◑ P_i (mM)
Die Nikkomycinbildung wurde im Plattendiffusionstest ermittelt.

Unter den gegebenen Bedingungen (s. II.4.5.1.) ergibt sich folgendes Bild:

1. Das für viele Antibiotika-Fermentationen typische Verhalten einer Tropophase-Idiophase-Dynamik kann auch für die Nikkomycinbildung angenommen werden.
2. Die Phosphationenkonzentration ist nach 60 Stunden, die Harnstoffkonzentration nach 70 Stunden erschöpft. Die Nikkomycinbildung setzt mit der 65. Stunde ein und läuft somit unter phosphat- und stickstofflimitierten Bedingungen ab. Die Produktion hört mit der 100. Stunde bei gleichzeitiger Erschöpfung der C-Quelle auf.
3. Es wurde eine maximale Produktbildungsgeschwindigkeit von 3,3 mg Nikkomycin pro Liter und Stunde erreicht. Die Ausbeute lag nach 100 Stunden bei 100 mg Nikkomycin pro Liter.

4. Einfluß der Phosphat-Ionen-Konzentration auf die Nikkomycin-Bildung

Bei vielen Antibiotika-Fermentationen stellt Phosphat einen wichtigen wachstumslimitierenden Nährmedienbestandteil dar. Anorganisches Phosphat unterstützt das Wachstum in Konzentrationen von 0,3 bis 300 mM. Konzentrationen ab 10 mM reprimieren jedoch in sehr vielen Fällen die Produktion von Antibiotika (Martin and Demain, 1980).

Phosphat reguliert die Biosynthese von Antibiotika aus verschiedenen chemischen Gruppen wie z.B. Peptid-Antibiotika, Polyen-Makroliden, Tetrazyklinen u.a. Die industrielle Produktion dieser Antibiotika wird daher unter wachstumslimitierenden Phosphatkonzentrationen durchgeführt.

Über den Mechanismus dieses sogenannten "Phosphat-Effektes" auf die Bildung von Antibiotika resp. sekundärer Metabolite gibt es eine Reihe von Hypothesen (s. Martin, 1977).

Es wurde nun untersucht, in welchem Ausmaß die Nikkomycin-Synthese von der Phosphatkonzentration im Medium abhängt. Als Medium wurde das unter Abschnitt III.2. beschriebene definierte Stärke/Harnstoff-Medium 3 verwendet. Um pH-Einflüsse auf definierten Medien zu vermeiden, wurde in Schüttelkolbenversuchen der pH mit Hilfe von nichttoxischen, nichtmetabolisierbaren organischen Puffern konstant gehalten (Aharonowitz and Demain, 1977).
Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt.

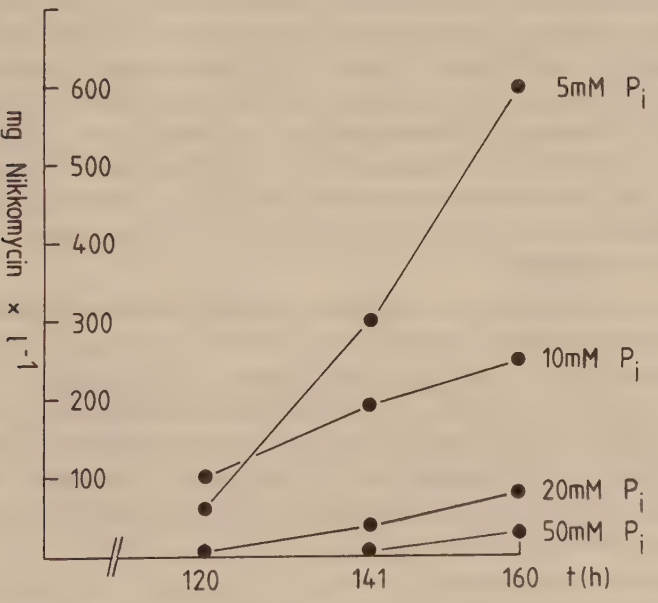


Abb. 8: Einfluß von K_2HPO_4 auf die Nikkomycinbildung in Gegenwart von 100 mM MES-Puffer (pK_a 6,15). Die Nikkomycinbildung wurde im Plattendiffusionstest mit Mucor hiemalis als Testorganismus ermittelt. Bei 100 mM K_2HPO_4 war kein Nikkomycin mehr nachweisbar.

Aus der Abbildung geht hervor, daß die Nikkomycin-Synthese durch Erhöhung der Phosphat-Ionen-Konzentration im Me-

dium deutlich reprimiert wird.

Die Regulation der Nikkomycin-Biosynthese scheint somit der Kontrolle durch Phosphationen zu unterliegen.

5. batch-Fermentation auf komplexem Medium

Die Nikkomycinbildung ist auf dem unter III.2. beschriebenen definierten Medium äußerst unbefriedigend. Auf dem von Dehler (1979) optimierten Komplex-Medium 4 liegt die Produktion um das 10fache höher. In allen weiteren Untersuchungen zur Optimierung der Nikkomycinherstellung wurde daher im Fermenter dieses Medium, bestehend aus 1 % Stärke, 3 % Mannit, 2 % Sojamehl und 2 % Hefeextrakt, verwendet. Die Fermentationsparameter Belüftung, Drehzahl und Temperatur waren ebenfalls schon von Dehler optimiert und wurden übernommen.

Da die Nikkomycine im neutralen und alkalischen pH-Bereich eine überraschende Instabilität zeigten (Keckeisen, 1979), erschien es wichtig, eine pH-Optimierung durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde zu Schüttelkulturen eine hohe Konzentration zwitterionischer Puffer verschiedener pK_a-Werte gegeben. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 zu sehen. Der Puffer mit dem sauersten pK_a-Wert, MES, brachte die beste Nikkomycinproduktion.

Weitere Untersuchungen im Fermenter zeigten, daß ein Anfangs-pH von 5,5 für die Nikkomycinproduktion sehr günstig ist und gleichzeitig die Melaninbildung unterdrückt.

Während der ersten 30 Fermentationsstunden alkalisiert die Kultur, so daß der pH durch Säurezugabe bei 5,5 gehalten werden sollte. Eine Alkalisierung zu Beginn der Fermentation über pH 7,0 brachte eine erhebliche Ausbeuteminderung. Nach der 30. Fermentationsstunde tritt ein stetiges selbständiges Ansäuern der Kultur bis auf pH 4,0 ein. Nach der 120. Std. wurde eine erneute Alkalisierung beobachtet.

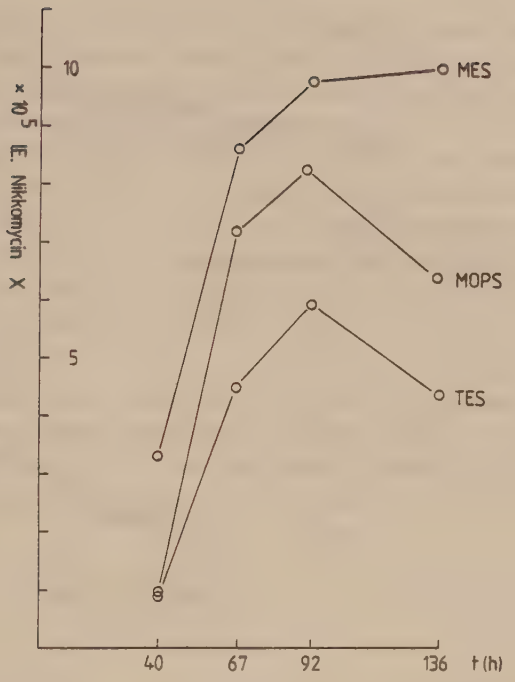


Abb. 9: Abhängigkeit der Nikkomycinbildung vom pH-Wert. Die Nikkomycin X Produktion wurde in HPLC-Integrationseinheiten (I.E.) gegen die Zeit aufgetragen. Tü 901/8c wurde in Schüttelkultur auf komplexem Medium in Gegenwart von zwitterionischen, nichtmetabolisierbaren Puffern (100 mM) inkubiert. Die Puffer hatten folgende pK_a-Werte: MES 6,15; MOPS 7,2; TES 7,5.

Abbildung 10 zeigt die Analyse einer Nikkomycin batch-Fermentation auf komplexem Medium. Die Fermentationsbedingungen sind unter II.4.5.1. genau beschrieben.

Nach ungefähr 35 Stunden Fermentationszeit ist die Stärke aufgebraucht. Die Wachstumsphase schließt ungefähr mit der 40. Stunde ab. Ungefähr gleichzeitig setzt die Produktion der Nikkomycine ein. Die P_i-Konzentration nimmt bis zur 60. Stunde bis unter 1 mM ab. Die Nikkomycinproduktions-

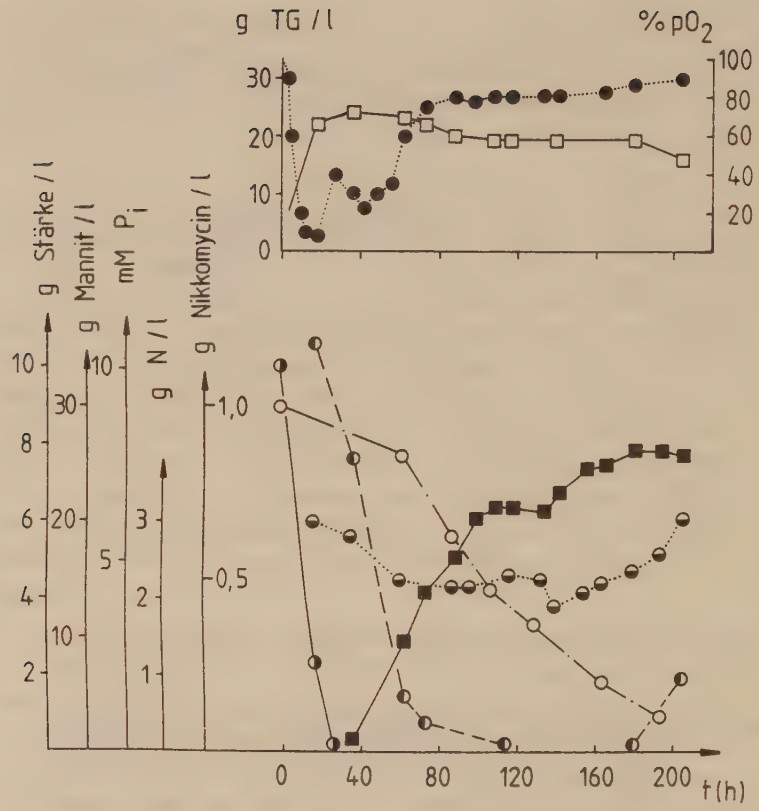


Abb. 10: Typischer Verlauf einer Nikkomycin batch-Fermentation auf dem Produktionsmedium (1 % Stärke, 3 % Mannit, 2 % Sojamehl, 2 % Hefeextrakt) im 20 l Fermenter.
●····● pO_2; □—□ Trockengewicht (g/l); ■—■ Nikkomycin Z,X,I,J (g/l); ◑—◑ Stärke (g/l); ○···○ Mannit (g/l); ◐—◐ P_i (mM); ◒····◒ N-Gehalt (g/l)

kurve erreicht nach 120 Stunden ein Plateau, um nach einiger Zeit erneut wieder leicht anzusteigen. Das erneute Ansteigen wird auf ein kryptisches Wachstum auf bereits lysierten Zellen zurückgeführt. Die kryptisch wachsenden Zellen gelangen dann ebenfalls in die Idiophase. Mannit

ist um die 200. Stunde aufgebraucht. Zu diesem Zeitpunkt steigt der P_i-Gehalt durch Lyse der Zellen wieder an und die Produktbildungskurve fällt erneut ab. Der pO_2-Verlauf zeigt unter den gegebenen Bedingungen ein typisches Minimum um die 15. bis 20. Stunde. In vielen Fermentationen sinkt der pO_2 bis auf unter 5 %. Das zweite Minimum um die 40. Std. ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Typisch ist das starke Ansteigen des pO_2 nach 60 bis 70 Stunden, welches mit der P_i-Limitierung zusammenfällt. Der Stickstoffgehalt des Kulturfiltrats liegt zu jedem Zeitpunkt über 1,8 g N/l.

Die Messung der Viskosität zeigte ein Maximum zur 50. Fermentationsstunde, gefolgt von einem Absinken bis zur 160. Stunde. Beim Durchlaufen des Viskositätsmaximums setzte die Nikkomycin-Bildung ein (Abb. 11).

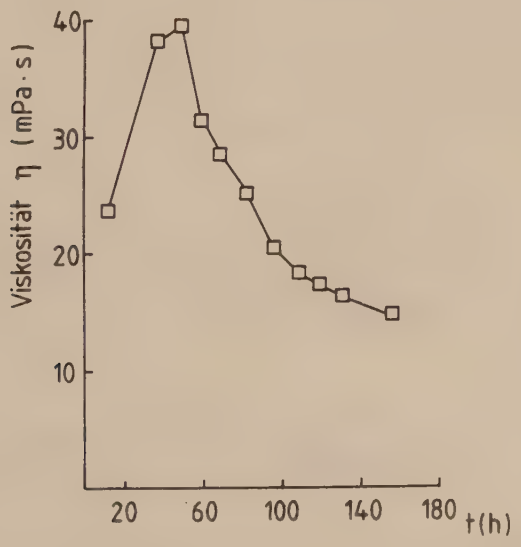


Abb. 11: Viskositätsprofil einer Nikkomycin batch-Fermentation auf komplexem Medium im 20 l Fermenter.

Aus der bisherigen Analyse läßt sich das Abknicken der Nikkomycinbildungsgeschwindigkeit um die 120. Stunde nicht erklären. Da jedoch die P_i-Ionen-Konzentration zur 120. Stunde gleich Null ist, wurde versucht, durch Zusatz von P_i-Ionen in der 50. Stunde eine Verbesserung zu erreichen. Die Zugabe von P_i brachte jedoch keine Steigerung der Nikkomycinproduktion, und bei Konzentrationen ab 10 mM trat die erwartete Phosphatrepression auf.

In Abbildung 12 sind im oberen Teil der Zeichnung die Produktionskurven der verschiedenen biologisch aktiven Nikkomycine dargestellt. Deutlich ist auch hier die Verlangsamung der Produktbildungsgeschwindigkeiten ab der 110. - 120. Stunde.

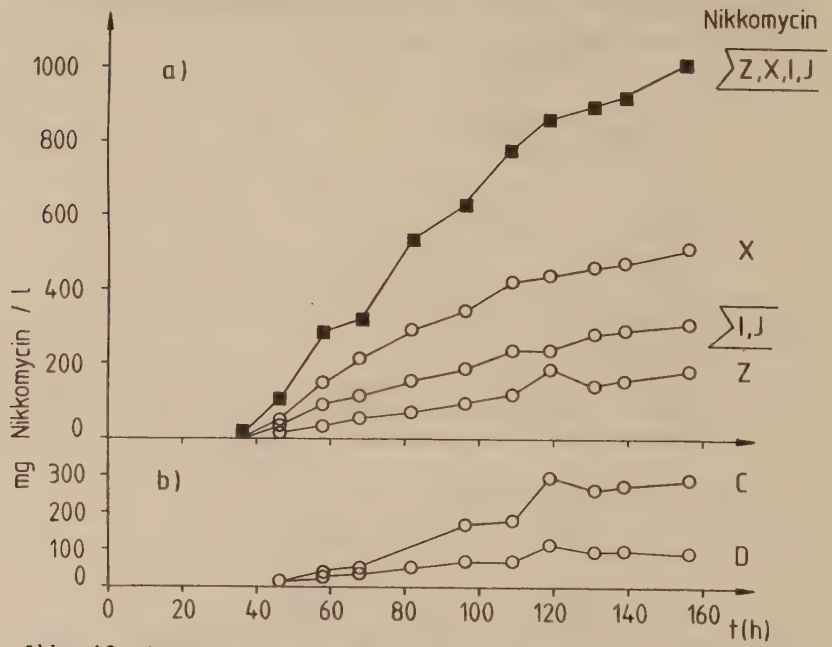


Abb. 12: Quantitative Bestimmung der verschiedenen Nikkomycine während einer batch-Fermentation auf komplexem Medium.
a) biologisch aktive Nikkomycine
b) biologisch inaktive Nikkomycine
Die Werte wurden mit Hilfe der HPLC ermittelt.

Im unteren Teil der Zeichnung sind die Produktionsverläufe der biologisch inaktiven Nikkomycine C und D dargestellt. Auffallend ist, daß D in geringeren Konzentrationen vorliegt als C. Nimmt man an, daß C und D Spaltprodukte von Z und X sind, so sollte eigentlich ein Verhältnis 1:1 auftreten. Eine mögliche Ursache dieses ungleichen Auftretens könnte eine leichtere Wiederverwertung von Nikkomycin D durch den Produzenten selbst beziehungsweise das Vorhandensein eines D abbauenden oder modifizierenden Enzyms sein.

6. "feed"-Prozesse - ein methodischer Überblick

Bei den meisten Antibiotikafermentationen läßt sich durch Optimierung der Prozeßführung mehr erreichen als durch Optimierung einzelner Parameter wie z.B. der Durchmischung oder des Massen-Transfers (Küenzi, 1978). Daher kommt im Programm zur Ausbeuteverbesserung nach der genetischen Bearbeitung des Produzenten der Entwicklung eines "feed"-Prozesses ein hoher Stellenwert zu (Auden et al., 1978).

Der Begriff "fed-batch" wurde von Yoshida et al. (1973) eingeführt und bezeichnet eine batch-Fermentation, bei der kontinuierlich vollständiges Nährmedium zugeführt wird. Im Gegensatz zum Chemostaten nimmt dabei das Volumen stetig zu und die Wachstumsgeschwindigkeit ändert sich laufend (Pirt, 1967).

Andererseits kann man bei einer nicht mit dem Wachstum gekoppelten Antibiotikaproduktion durch langsames "feeding" einer Energiequelle in der Produktionsphase eine Ausbeutesteigerung erreichen (Kao, 1976).

Ziel der Entwicklung eines "feed"-Prozesses ist es, dem Antibiotika-Produzenten Nährstoffbedingungen zu schaffen für eine lange Produktionsphase bei maximaler Produktbildungsgeschwindigkeit. Bei einem batch-Prozeß sind diese

Bedingungen nur für eine relativ kurze Zeitspanne gegeben. So ist zum Beispiel die Beschränkung der Substratzufütterung über eine langsame feeding-Rate eine wichtige Methode zur Vermeidung einer "Kohlenstoff-Katabolit-Repression" (Demain, 1972), wie sie für zahlreiche Antibiotikaproduzenten beschrieben wurde (Drew et al., 1977; Martin et al., 1974; Demain et al., 1979; Aharonowitz et al., 1978). Durch langsames Zufüttern von Glucose läßt sich sowohl die Penicillin-Synthese (Soltero et al., 1954) als auch die Synthese von Candidin und Candihexin stimulieren (Martin et al., 1974). Neben der Kohlenstoff-Katabolit-Repression bzw. -Inhibition (Demain et al., 1978) können auch andere Gründe für einen "feed"-Prozeß sprechen. So z.B. die Steuerung der Wachstumsgeschwindigkeit (Queener and Schwartz, 1979), die Versorgung mit Vorstufen, wie das "feeden" von Phenylessigsäure bei der Penicillin G Fermentation (Perlman, 1970), und ein Vermeiden kritischer pO_2-Werte wie beim Rifamycin (Virgilio et al., 1964) und Capreomycin und Cephalosporin (Feren et al., 1969).

Küenzi (1978) unterscheidet 3 Arten von "feed"-Prozessen. Zunächst die Zufütterung von Nährsubstrat und gegebenenfalls Vorstufen mit konstanter vorgegebener feeding-Rate. Diese Methode hat den Nachteil, daß auf veränderte Fermentationsläufe bzw. veränderte physiologische Bedingungen nicht reagiert werden kann. In der Praxis führen schon kleine Variationen im Medienmaterial bzw. der Animpfkultur zu zeitlichen Verschiebungen im Fermentationsverlauf.

Mit Hilfe von flexiblen "feeding"-Systemen, die den sich variierenden physiologischen Bedürfnissen des Antibiotika-Produzenten eher entsprechen können, werden solche Veränderungen kompensiert. pH, pO_2 oder Gas-Austausch-Raten geben direkte Informationen über die Stoffwechselaktivität des Organismus. Sie können somit als Sensoren für die Bestimmung der feeding-Rate dienen.

In einem schwach gepufferten Medium führt die Zufuhr von Zuckern zu einem Absinken des pH-Wertes, wohingegen eine

Erschöpfung der C-Quelle eine Alkalisierung des pH-Wertes bewirkt. Beim "pH-feeding" wird die Reglung so aufgebaut, daß beim Überschreiten eines bestimmten pH-Sollwertes z.B. Glucose zugegeben wird. Der Abbau der Glucose führt zu einer teilweisen Ausscheidung von organischen Säuren, was ein Absinken des pH-Wertes zur Folge hat. Nach der Verwertung dieser Säuren steigt der pH wieder an und die Reglung beginnt erneut. Man erreicht somit ein Pendeln des pH-Wertes um den eingestellten Sollwert. Über die Wahl des Sollwertes läßt sich die feeding-Rate variieren (Pan et al., 1972). Die Methode des pH-feedings hat den Nachteil, daß sich die Pufferkapazität der Kultur mit fortschreitender Fermentation vergrößert und somit die Ansprechzeiten des Systems länger werden. Beim "feeding" von Nährlösungen, die ein weiteres Wachstum der Kultur ermöglichen, besteht außerdem die Gefahr einer O_2-Limitierung.

Eine weitere flexible Methode stellt das "pO_2-feeding" dar. Hierbei erfolgt die Substratversorgung in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck in der Fermentationskultur, so daß eine O_2-Limitierung vermieden werden kann. Der O_2-Bedarf einer Kultur hängt vom Substrat-Verbrauch ab. Bei hoher Stoffwechselaktivität sinkt der pO_2-Wert. Ist die C-Quelle erschöpft, so steigt der pO_2 an. Der pO_2-Wert kann somit durch Zufütterung von Substrat über ein Regelsystem bei einem vorgegebenen Sollwert konstant gehalten werden (Squires, 1972). Die feeding-Rate ist dabei abhängig von der Wahl dieses pO_2-Sollwertes.

7. pO_2-feeding-Fermentation auf komplexem Medium

Für die Nikkomycinproduktion sollte nun ein pO_2-feeding-Prozeß entwickelt werden. Ausgangspunkt war der von Dehler (1979) optimierte batch-Ansatz. Medium, Temperatur, Drehzahl, pH, Animpfmenge, Belüftung wurden übernommen (s. Abschnitt II.4.5.1.). Lediglich das Alter der Vorkulturen wurde auf 24 - 30 Std. gesenkt.

Die Analytik der batch-Fermentation auf komplexem Medium ergab eine Stagnation der Nikkomycinproduktion nach 110 Stunden, obwohl noch ausreichend C-Quelle in Form von Mannit vorhanden war. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß Mannit eine zu langsam verwertbare C-Quelle für die Aufrechterhaltung der Produktionsphase darstellt. Durch Zufütterung einer schneller metabolisierbaren C-Quelle in nicht zu hohen Konzentrationen sollte versucht werden, die Produktionsphase zu verlängern. Als C-Quelle wurde Glucose gewählt, da sie in sehr großen Mengen in Wasser löslich ist und das "feeden" somit nicht zu einer großen Volumenzunahme im Fermenter führt. Da die Nikkomycine stickstoffhaltige Verbindungen sind, wurde der Glucose noch Asparagin als N-Quelle zugesetzt. Stickstoff war zwar noch nach der 110. Stunde im Kulturfiltrat vorhanden; über dessen Verfügbarkeit für den Organismus waren jedoch keine Aussagen möglich. Der Glucose-Asparagin Lösung wurde kein Phosphat hinzugesetzt, um eine Zunahme der Biomasse zu vermeiden. Ein pO_2 von 60 % wurde zunächst als Sollwert gewählt, da bei diesem Wert noch keine O_2-Limitierung auftritt und die gefeedete Glucosekonzentration auf Grund der niedrigen feeding-Rate nicht zu hoch sein sollte. Das feeding wurde nach Durchlaufen des zweiten pO_2-Minimums beim Wiederanstieg des pO_2-Wertes auf über 60 % gestartet. Zu Beginn der Fermentation wurde der pH derart geregelt, daß eine Alkalisierung über 6,0 vermieden wurde. Nach dem selbständigen Ansäuern der Kultur und nach Start des feeding-Prozesses wurde die Fermentation pH-statisch bei 4,8 weitergeführt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

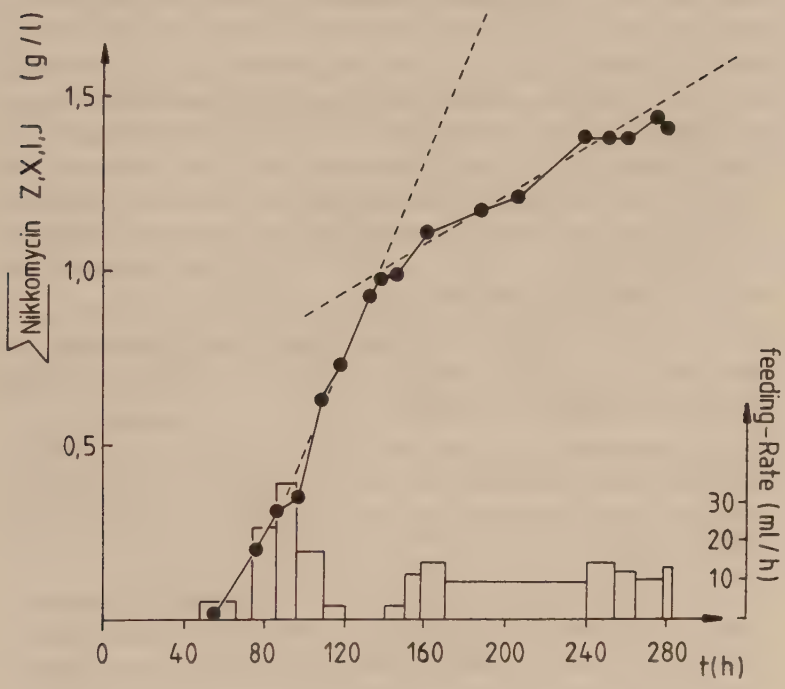


Abb. 13: pO_2-feeding-Fermentation des Stammes Tü 901/8c. In der Abbildung ist sowohl die Nikkomycin-Produktion als auch die feeding-Rate eingezeichnet. Die gestrichelten Linien deuten die jeweilige Steigung der Produktbildungskurve an. Gefeedet wurde mit der feeding-Lösung A bei einem pO_2-Sollwert von 60 %.

Im Vergleich zur batch-Fermentation konnte durch das pO_2-feeding die Ausbeute gesteigert werden, bei unverändert gleicher maximaler Produktbildungsgeschwindigkeit von 13,7 mg Nikkomycin Z,X,I,J pro Liter und Stunde. Die Phase der maximalen Produktbildungsgeschwindigkeit war bei der batch-Fermentation 70 Stunden lang und beim pO_2-feeding Prozeß 114 Stunden. Beim batch verlangsamte sich die Bil-

dungsgeschwindigkeit ab der 98. Stunde, beim pO_2-feeding erst nach der 140. Stunde. Während im batch-Ansatz nach der 110. Stunde eine Stagnation der Produktion für ungefähr 30 Stunden auftrat, lief die Produktion im feeding-Ansatz ab der 140. Stunde mit einer durchschnittlichen Produktbildungsgeschwindigkeit von 3,3 mg Nikkomycin Z,X, I,J/l/Stunde bis zur 280. Stunde weiter. Die Ausbeuten betrugen im batch nach 110 Stunden 0,7 g/l, nach 180 Stunden 0,87 g/l und im feeding-Ansatz nach 140 Stunden 0,97 g/l, nach 280 Stunden 1,44 g/l. Wobei sich die Mengen jeweils auf die Summe von Nikkomycin Z,X,I,J beziehen.

Das maximale Trockengewicht lag sowohl beim batch- als auch beim pO_2-feeding-Ansatz bei 25 g/l. Durch das "feeden" wurde kein Wachstum induziert.

Die Verlangsamung der Nikkomycinbildungsgeschwindigkeit während des pO_2-feedings ab der 140. Stunde wurde auf eine nicht optimale Zusammensetzung der feeding-Lösung zurückgeführt.

Da ein Testen verschiedener feeding-Lösungen im Fermenter jedoch mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden ist, wurde nach einem Verfahren gesucht, um potentielle Vorstufen bzw. Effektoren der Nikkomycin-Synthese schneller und mit höherem Durchsatz in Kolbenversuchen durchzutesten.

8. Entwicklung eines resting-cell Systems

Verfüttert man Moleküle, die als Energie-, C- oder N-Quelle dienen können, so werden oft neue Enzyme gebildet, andere werden reprimiert - je nach Natur der verfütterten Verbindung. Solche Phänomene des Wandels im Enzymprofil des Primärstoffwechsels sind das Ergebnis der Kontrolle des Primärstoffwechsels auf Transkriptions- und Posttranskriptionsebene. Diese Veränderungen beeinflussen direkt das Poolniveau von End- und Zwischenprodukten des Primär-

stoffwechsels und somit gleichzeitig den Pool von Vorstufen für den Sekundärstoffwechsel (Aharonowitz and Demain, 1980).

Für Antibiotikabiosynthesen bzw. Untersuchungen zur Regulation der Antibiotikabildung ist die Methode der "resting-cells" beschrieben (Martin, 1976; Demain, 1978). Dabei werden Zellen aus Kulturen mit Produktionsmedium geerntet, gewaschen und in Puffer oder in einem nicht das Wachstum fördernden Medium zur weiteren Antibiotikaproduktion resuspendiert.

Es wurde versucht, für den Nikkomycinproduzenten Tü 901/8c ein solches System zu entwickeln.

Folgende Überlegungen wurden bei der Zusammenstellung des Mediums berücksichtigt:

1. Es sollte phosphatfrei sein, um eine weitere Zunahme der Biomasse zu vermeiden.
2. Der Stoffwechsel sollte eine weitere Nikkomycin-Produktion erlauben; aus diesem Grund wurde eine C- und eine N-Quelle angeboten.
3. Um pH-Einflüsse bei Verfütterungen zu vermeiden, wurden 50 mM MES als Puffer hinzugegeben.

Darüberhinaus enthielt das Medium Spurenelemente und Saline (0,9 %). Als N-Quelle diente Asparagin. Die Variation der C-Quelle brachte das in Tabelle 3 dargestellte Ergebnis. Mannit, Glucose und Glycerin erschienen gleich gut geeignet. In den Kolben mit Glucose und vor allem mit Glycerin trat eine starke, mit Essigester extrahierbare Gelbfärbung auf. DC-Chromatographie, UV-Spektrum und die biologische Wirkung gegen Bacillus subtilis auf α-Medium bestätigten den Verdacht, daß es sich um ein von Tü 901 auf anderen Medien nur in Spuren gebildetes, oxidationsempfindliches Naphthochinon handelt (Langhärig, 1979). Das resting-cell mit Glycerin als C-Quelle bietet somit die Möglichkeit, diese Substanz in größeren Mengen für eine Strukturaufklärung und andere Untersuchungen zu gewinnen.

Tabelle 3: Variation der C-Quelle im resting-cell Medium
Es wurden jeweils 1 % C-Quelle eingesetzt. Die Nikkomycinbildung wurde nach 48 Stunden im Plattendiffusionstest ermittelt.

	Zygosporenhemmung (mm)
Mannit	32
Lactose	23
Glucose	32
Glycerin	32
Kontrolle ohne C-Quelle	26

Um eine Beeinflussung der Nikkomycinbildung durch das Naphthochinon zu vermeiden, wurde bei allen weiteren Untersuchungen zur Nikkomycinsynthese Mannit als C-Quelle verwendet, da es zudem auch im Produktionsmedium vorhanden ist.

In Abbildung 14 ist die Nikkomycinproduktion im resting-cell dargestellt. Die Zellen von Tü 901/8c waren nach 72 Stunden Inkubation auf dem Produktionsmedium geerntet worden.

Die Produktion von Nikkomycin X liegt mit maximal 35 mg/l im Vergleich zum komplexen Medium ausgesprochen niedrig. Nikkomycin Z war im HPLC nicht nachweisbar. Der pH blieb während des gesamten Zeitraums relativ konstant. Während der Inkubation auf dem resting-cell Medium ist eine Zunahme des Trockengewichts bis zur 49. Stunde festzustellen. Dies beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein von Restphosphaten bzw. auf der Ablagerung von Reservestoffen in den Zellen.

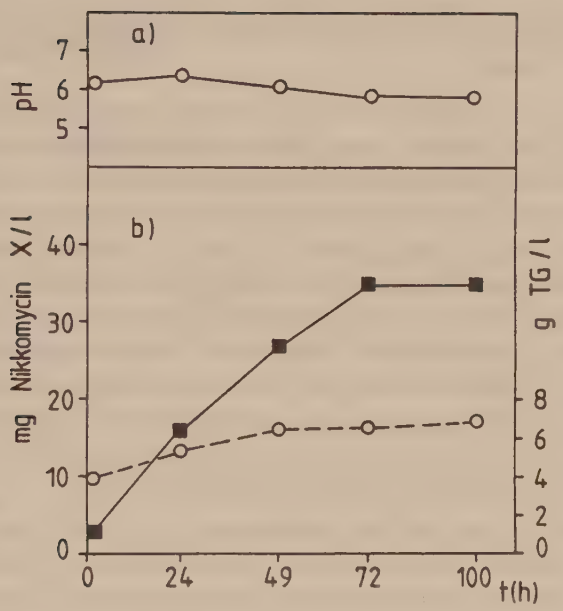


Abb. 14: Nikkomycin X Produktion im resting-cell in Gegenwart von 50 mM MES.
a) pH-Verlauf O—O ; b) Nikkomycin X (mg/l) ■—■ ; Trockengewicht (g/l) O--O .
Die Nikkomycin X Konzentration wurde mit Hilfe der HPLC ermittelt.

9. Verfütterung potentieller Vorstufen und Suche nach Effektoren der Nikkomycinsynthese im resting-cell

Wie in der Literatur beschrieben, zeigt die Verfütterung von Antibiotikavorstufen nicht immer eine stimulierende Wirkung auf die Antibiotikasynthese, da in vielen Fällen die Bereitstellung bestimmter Vorstufen keinen limitierenden Faktor darstellt. Das Suchen nach Substanzen, die die Antibiotikaproduktion stimulieren, bringt andererseits oft gute Ergebnisse. Die Wirkung dieser Effektoren, die keine

direkten Vorstufen darstellen, beruht auf einer Interaktion mit Regulationsmechanismen des Produzenten (Wang et al., 1979).

Da keine Informationen über die Biosynthese der pyridinhaltigen Aminosäureseitenkette der Nikkomycine vorlagen, wurde die Wirkung diverser Metabolite des Primärstoffwechsels auf die Nikkomycinbildung im resting-cell untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Zellen aus der frühen Produktionphase nach 72 Stunden geerntet, gewaschen und, wie unter Abschnitt II.4.4. beschrieben, gleichmäßig in Kolben mit resting-cell Medium transferiert. Die Kolben waren jeweils mit 100 mg verschiedener Primärmetabolite supplementiert. Die Nikkomycinbildung konnte bei diesen ersten Versuchen nur mit Hilfe des Plattendiffusionstestes und Mucor hiemalis als Testorganismus ermittelt werden.

Das Ergebnis sah wie folgt aus:

1. Von allen getesteten 21 L-Aminosäuren brachte L-Leucin und L-Isoleucin bei weitem, mit jeweils +181 % gegenüber der Kontrolle, die höchste Stimulierung der Nikkomycinsynthese. Alle anderen getesteten Aminosäuren lagen mit ±20 % im Bereich der Kontrolle.
2. Ebenfalls im Bereich der Kontrolle lagen die potentiellen Vorstufen der pyridinhaltigen Nikkomycinaminosäure: Chinolinsäure, Nicotinsäure, Nicotinsäureamid und L-Tryptophan.

10. pO_2-feeding-Fermentation unter Zusatz von L-Leucin zur feeding-Lösung

Der beobachtete Effekt, daß L-Leucin und L-Isoleucin im resting-cell die Bildung der Nikkomycine stimuliert, sollte nun auf die pO_2-feeding-Fermentation im 20 l Fermenter übertragen werden. Aus diesem Grund wurde der feeding-Lösung L-Leucin zugesetzt. Das pO_2-feeding wurde ansonsten wie in Abschnitt III.7. beschrieben durchgeführt. Bei der ersten Fermentation wurde der pO_2-Sollwert auf 60 %, bei einer weiteren Fermentation auf 40 % festgesetzt.

Abbildung 15 veranschaulicht die Ergebnisse im Vergleich zu den bisherigen Fermentationen auf komplexem Medium.

Am Verlauf der Nikkomycinproduktionskurven ist deutlich zu erkennen, daß in Anwesenheit von L-Leucin die Phase der maximalen Produktbildungsgeschwindigkeit verlängert ist. Das Abknicken der Produktionskurve erfolgt wesentlich später und weniger stark. Die Produktbildungsgeschwindigkeit nimmt langsamer ab. Das beste Ergebnis wurde durch feeding bei einem pO_2-Sollwert von 40 % erreicht. Bei dieser Fermentation lag die Ausbeute an Nikkomycin Z,X,I,J nach 300 Stunden bei 2,73 g/l.

In Abbildung 16 ist der Verlauf einer feeding-Fermentation bei einem pO_2-Sollwert von 40 % dargestellt. Der feeding-Lösung war neben Leucin noch Phosphat zugesetzt worden, um bei der langen Fermentationszeit keine absolute Phosphatlimitierung zu erhalten. Darüberhinaus ist an der Biosynthese der Aminouronsäure Phosphat beteiligt. Die zugeführte Phosphatkonzentration war so bemessen, daß pro Stunde bei einer durchschnittlichen feeding-Rate nicht mehr als 10 µMol Phosphat pro Liter und Stunde in den Fermenter gelangten. Die Konzentration war so niedrig gewählt, daß keine Phosphatrepression ausgelöst werden konnte.

Die Analytik der Fermentation zeigte, daß die Phosphatkonzentration während des gesamten feeding-Prozesses sehr

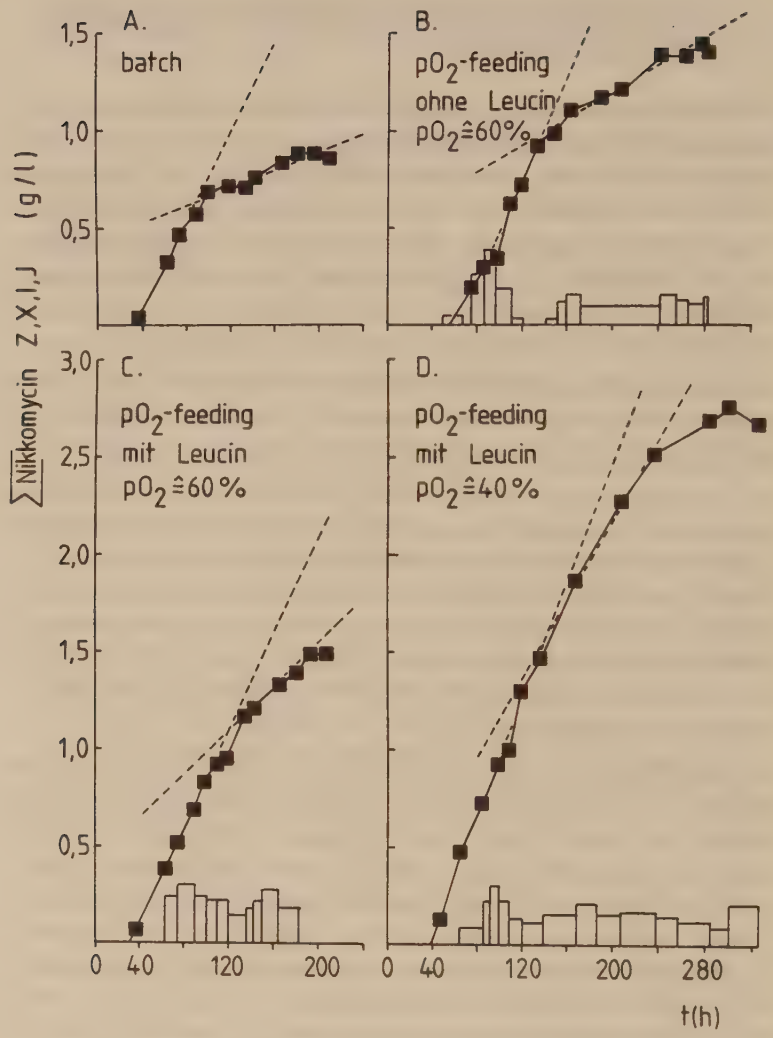


Abb. 15: Vergleich der Nikkomycinproduktionskurven wichtiger Fermentationen.
A. batch
B. pO_2-feeding, pO_2 ≙ 60 %, feeding-Lösung A
C. pO_2-feeding, pO_2 ≙ 60 %, feeding-Lösung B
D. pO_2-feeding, pO_2 ≙ 40 %, feeding-Lösung B
Die jeweiligen feeding-Raten sind auf der Abszisse als Säulendiagramme dargestellt.

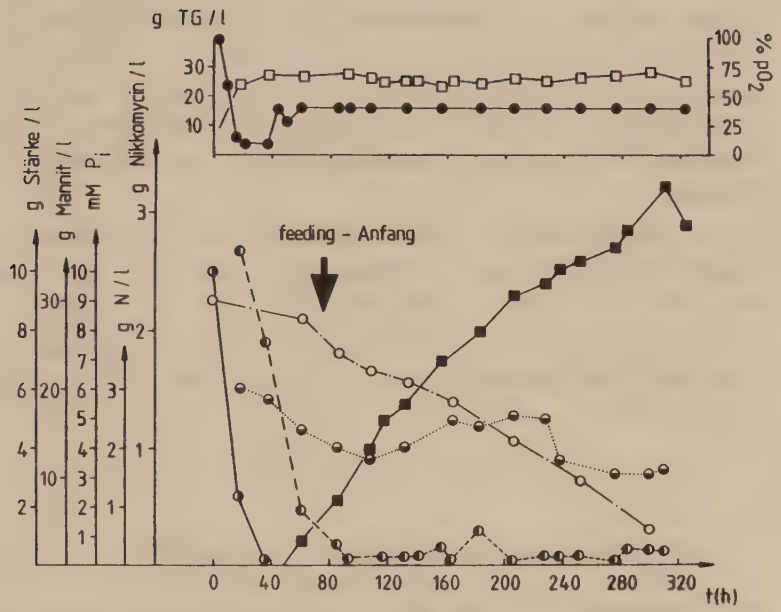


Abb. 16: Verlauf einer pO_2-feeding-Fermentation mit Leucin und Phosphat in der feeding-Lösung
■—■ Nikkomycin Z,X,I,J (g/l); ○···○ Mannit (g/l); ◑—◑ Stärke (g/l); ⊖·····⊖ Stickstoff (g/l); ◑- -◑ Phosphat (mM); □—□ TG (g/l); ●—● pO_2 (%).

niedrig blieb. Auch wurde durch das Zuführen von phosphathaltiger feeding-Lösung kein Wachstum induziert. Bemerkenswert ist die stetige langsame Abnahme der Mannitkonzentration bis zur 310. Stunde. Während des feedings wird demnach gleichzeitig Mannit und Glucose verwertet. Nach Verbrauch des Mannit sinkt die Nikkomycinproduktion und der Produzent beginnt zu lysieren. Dieser kritische Punkt läßt sich sicherlich durch Mannitzugabe bzw. durch veränderteProzeßführung vermeiden. Die Ausbeute dieser Fermen-

tation lag bei 3,15 g Nikkomycin Z,X,I,J pro Liter nach 310 Stunden.

Das maximale Trockengewicht erreichte bei allen feeding-Fermentationen ungefähr 25 g/l und blieb während des feedings, mit leichten Schwankungen, mehr oder weniger konstant.

Die Viskosität durchlief bei den feeding-Fermentationen, ebenso wie beim batch, ein Maximum, um sich dann auf einen Wert von 15 ± 2 mPa·s einzupendeln.

Durch das feeding in der beschriebenen Form bleibt das Verhältnis der verschiedenen Nikkomycine zueinander ungefähr gleich.

11. pO_2-feeding bei verschiedenen pO_2-Sollwerten

Es wurden mehrere pO_2-feeding Fermentationen mit L-Leucin in der feeding-Lösung bei verschiedenen pO_2-Sollwerten, unter sonst gleichen Bedingungen wie in Abschnitt III.7. + 10. beschrieben, durchgeführt. Vergleicht man die Ausbeuten der einzelnen Fermentationen nach 200 Stunden, so ergibt sich ein Optimum um den pO_2-Sollwert von 40 %. Niedrigere pO_2-Sollwerte scheinen zu einem "overfeeding" und somit einer schädlichen O_2-Limitierung bzw. eventuell einer Katabolit-Repression durch Glucose zu führen (Abb. 17).

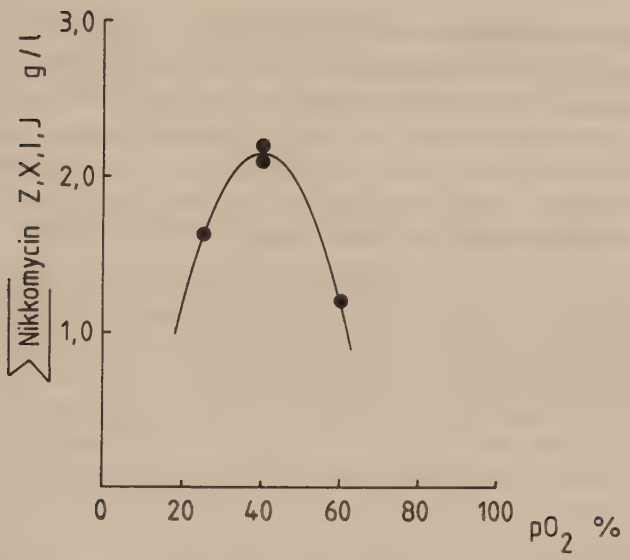


Abb. 17: Abhängigkeit der Nikkomycinausbeute vom pO_2-Sollwert bei pO_2-feeding Fermentationen. Die Werte wurden mit Hilfe der HPLC nach 200 Stunden Fermentation ermittelt.

12. Ermittlung des günstigsten Zeitpunktes zum pO_2-feeding Beginn

Zunächst war versucht worden, das feeding möglichst nach der 100. Fermentationsstunde zu starten, um das Mannit im Medium auszuschöpfen. Diese Versuche schlugen jedoch fehl. Die feeding-Lösung wurde nicht mehr richtig "angenommen" und das Einregeln auf den gewünschten pO_2-Sollwert bereitete größte Schwierigkeiten. Sehr wahrscheinlich sind diese Schwierigkeiten auf eine Differenzierung des Produzenten zurückzuführen.

Es hat sich daher bewährt, wie in Abschnitt III.7 beschrieben, sofort nach dem Ansteigen des pO_2-Sollwertes nach der 60. bis 70. Stunde die feeding-Lösung anzuschließen und auf den pO_2-Sollwert ± 5 % einzuregeln.

Selektive Produktion von Nikkomycin Z

Der Stamm Tü 901/8c bildet auf dem Produktionsmedium die Nikkomycine Z und X. Die chromatographische Trennung dieser beiden Verbindungen ist nur mit großem Aufwand und geringen Ausbeuten möglich. Es bestand daher das berechtigte Interesse, diese Verbindungen einzeln über einen Fermentationsprozeß in größeren Mengen herzustellen.

Von Perlman wurde der Begriff der "gerichteten Fermentation bzw. Biosynthese" geprägt. Man versteht darunter den Zusatz von Vorstufen zum Medium zur Gewinnung eines bestimmten Stoffwechselproduktes. Beispiele sind die Zufütterung von Phenylessigsäure zur Benzylpenicillinsäureherstellung, von Chloriden zur Chlortetrazyklinproduktion sowie von Propionat und Acetat zur Erythromycinproduktion (Rose, 1979).

Ein Ansatzpunkt zur selektiven Produktion von Nikkomycin Z bestand darin, daß Delzer (1980) bei Mutanten eine Verschiebung im Verhältnis von Nikkomycin Z und X nach Uracilverfütterung beobachtet hatte.

13. Uracil-Verfütterung in Schüttelkolbenversuchen auf komplexem Medium

Der Stamm Tü 901/8c wurde auf Medium 4 in Gegenwart verschiedener Uracil-Konzentrationen angezogen. In Abbildung 18 ist das Ergebnis dargestellt. Mit steigender Uracil-Konzentration nimmt gegenüber der Kontrolle die Menge an gebildetem Nikkomycin Z zu und gleichzeitig sinkt die Produktion von Nikkomycin X. Ab einer Uracil-Konzentration von 0,4 %, entsprechend 38,5 mM, ist im HPLC kein Nikkomycin mehr nachweisbar und es wird selektiv nur Nikkomycin Z gebildet. Im HPLC ist gleichzeitig eine Verschiebung der Produktion von Nikkomycin I nach Nikkomycin J festzustellen.

Uracil stimuliert somit die Synthese der Nikkomycine mit Uracil als Nucleobase und reprimiert die Bildung der Nikkomycine der 4-Formyl-4-imidazolin-2-on Reihe.

14. Uracil-Verfütterung während der Produktionsphase

Es wurde untersucht, welche Wirkung eine Verfütterung von Uracil auf die Nikkomycinbildung während der Produktionsphase hat. Also zu einem Zeitpunkt, zu dem schon Nikkomycin X vom Produzenten synthetisiert wird und somit die Enzyme der Nikkomycin X Synthese vorliegen.

In Abbildung 19 sind die Produktbildungskurven von zwei pO_2-feeding-Fermentationen abgebildet. Beide Fermentationen liefen nach den in Abschnitt III.10. beschriebenen Bedingungen ab. Fermentation A zeigt den Verlauf der Nikkomycin Z und X Produktion ohne Uracil-Zugabe zum Medium. Bei Fermentation B wurde nach 53 Stunden, also nach Beginn der Produktbildungsphase, Uracil in den Fermenter gegeben. Die Uracil-Konzentration betrug daraufhin im Fermenter 5 g/l entsprechend 48 mMol pro Liter.

Nach Uracil-Verfütterung ist deutlich eine sofortige Reprimierung der Nikkomycin X Synthese und ein Ansteigen der Nikkomycin Z Bildungsgeschwindigkeit zu erkennen. Die Nikkomycin X Konzentration blieb über den gesamten Fermentationszeitraum konstant.

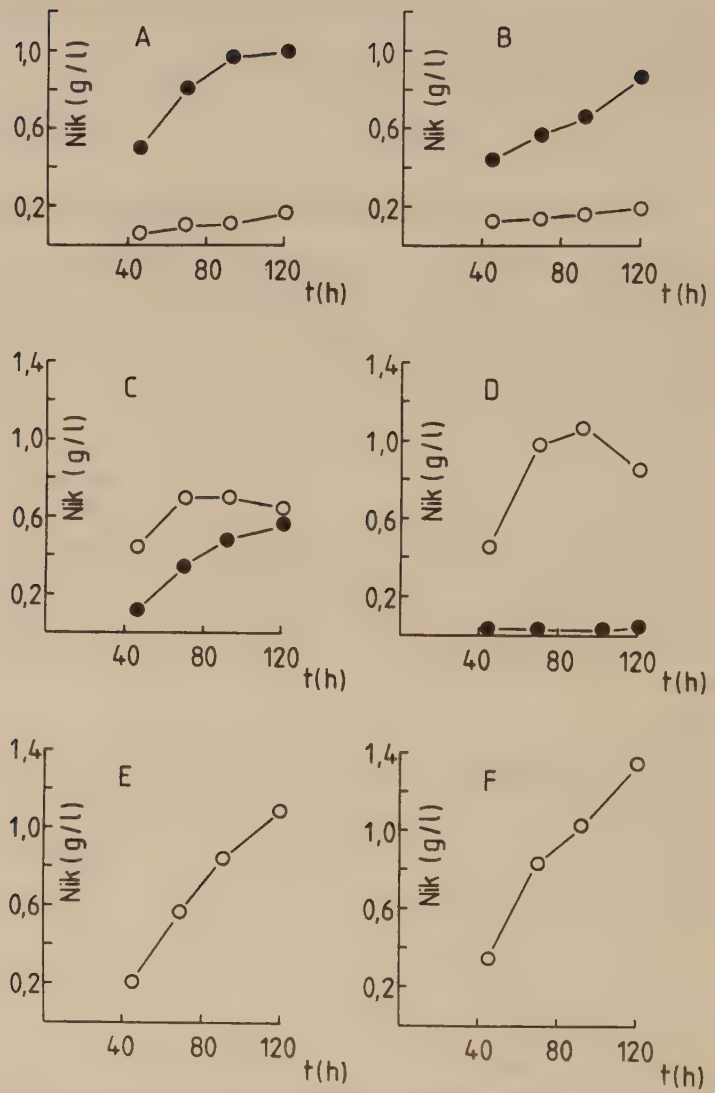


Abb. 18: Nikkomycinproduktion in Gegenwart steigender Uracil-Konzentrationen auf Medium 4.

A. Kontrolle, ohne Uracil
B. 0,01 % Uracil
C. 0,1 % Uracil
D. 0,2 % Uracil
E. 0,4 % Uracil
F. 0,6 % Uracil

●—● Nikkomycin X (g/l)
○—○ Nikkomycin Z (g/l)

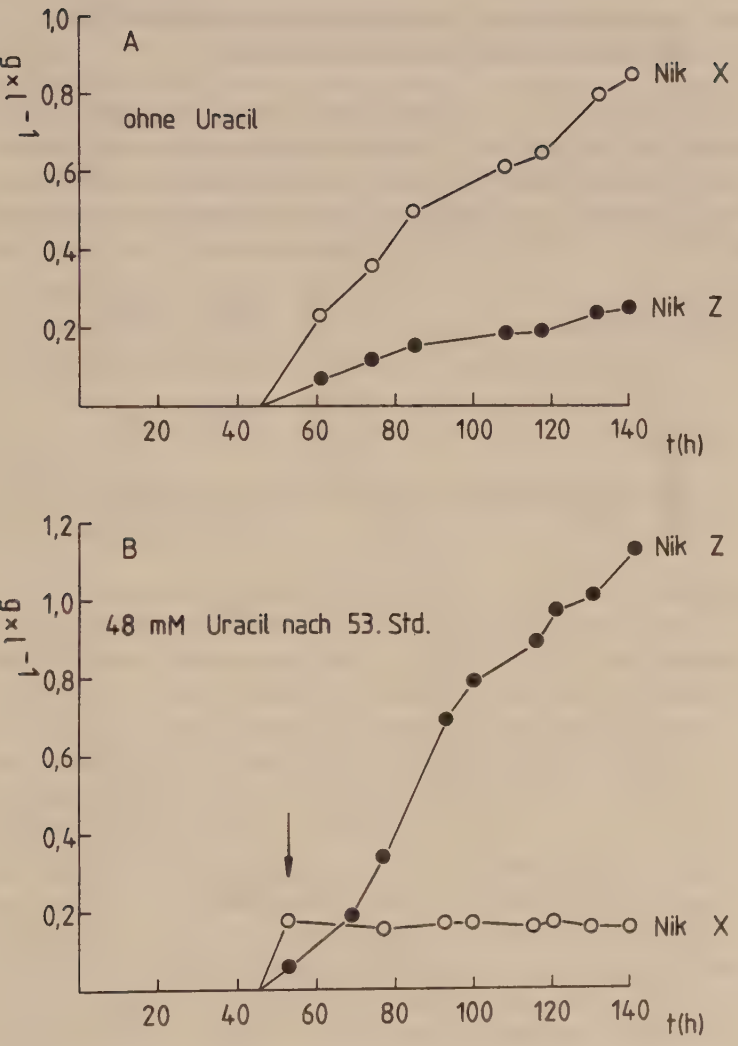


Abb. 19: Bildung von Nikkomycin Z und X während zweier pO_2-feeding Fermentationen.
A. pO_2-feeding ohne Uracil-Zusatz
B. pO_2-feeding mit Uracil-Zusatz in der 53. Fermentationsstunde
O—O Nikkomycin X (g/l)
●—● Nikkomycin Z (g/l)

15. Untersuchung des Einflusses von L-Leucin auf die Nikkomycin Z Bildung im resting-cell

Wie in Abschnitt III.8. beschrieben, wird im resting-cell System kein Nikkomycin Z gebildet. Nach Zusatz von Uracil (20 mM) konnte jedoch auch auf diesem Medium eine Nikkomycin Z Produktion erreicht werden; gleichzeitig wurde die Synthese von Nikkomycin X stark reprimiert.

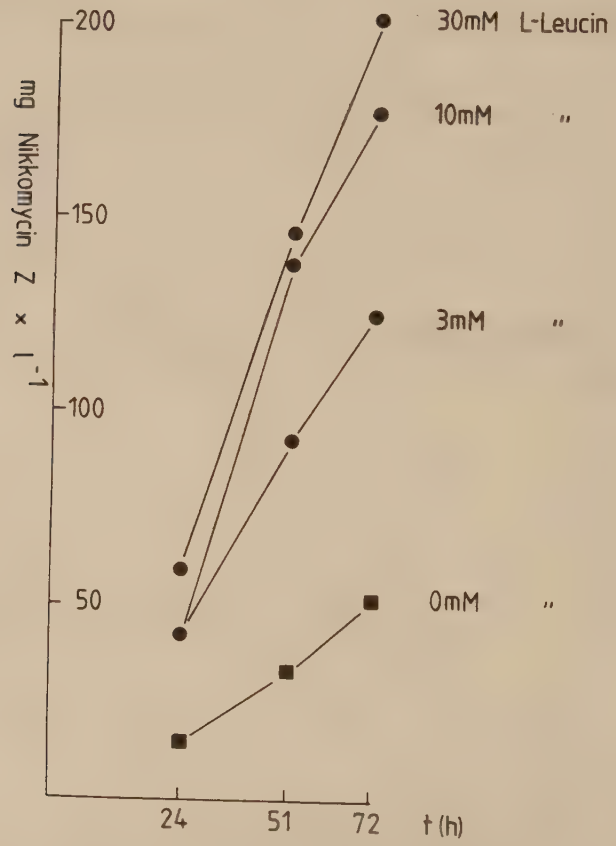


Abb. 20: Stimulierung der Nikkomycin Z Synthese durch L-Leucin im resting-cell. Das Medium enthielt zusätzlich 20 mM Uracil.

Für eine gerichtete Fermentation zur Herstellung von Nikkomycin Z in größeren Mengen war es nun von Interesse zu untersuchen, ob durch L-Leucin bzw. L-Isoleucin die Nikkomycin Z Bildung zusätzlich stimuliert werden kann. Dem Stamm Tü 901/8c wurden deshalb im resting-cell in Gegenwart von 20 mM Uracil unterschiedlich hohe L-Leucin Konzentrationen angeboten. Das Ergebnis dieses Versuchs ist aus Abbildung 20 zu entnehmen.

Die Synthese von Nikkomycin Z wird durch Zusatz von L-Leucin deutlich stimuliert. In Gegenwart von 30 mM L-Leucin wurde die Nikkomycin Z Bildung um +300 % gesteigert.

16. pO_2-feeding-Fermentation zur selektiven Produktion von Nikkomycin Z

Im 20 l Umwurffermenter wurde eine gerichtete pO_2-feeding Fermentation zur Produktion von X-freiem Nikkomycin Z durchgeführt. Abgesehen vom pO_2, der bei 55 % eingeregelt wurde, wurden die Fermentationsbedingungen wie in Abschnitt III.7. + 10. beschrieben eingehalten. Das Medium sowohl der Vorkultur, als auch des Fermenters war von Anfang an mit 50 mM Uracil supplementiert. Als feeding-Lösung wurde Lösung B (mit L-Leucin) verwendet.

Das Ergebnis dieser Fermentation ist in Abbildung 21 dargestellt. Nach 200 Stunden Fermentationszeit wurde eine Ausbeute von 3,2 g/l Nikkomycin Z erreicht. Nikkomycin X wurde nur in Spuren gebildet. Die Produktbildungsgeschwindigkeit betrug bis zur 100. Stunde 13,3 mg/l/Stunde und danach 21,0 mg/l/Stunde. Das maximale Trockengewicht lag bei 25 g/l.

Durch Vorgabe einer ausreichenden Uracil-Konzentration und zusätzlicher Stimulierung der Nikkomycin-Synthese durch L-Leucin konnte erstmals eine Steigerung der maximalen Produktbildungsgeschwindigkeit während der feeding-Phase erreicht werden.

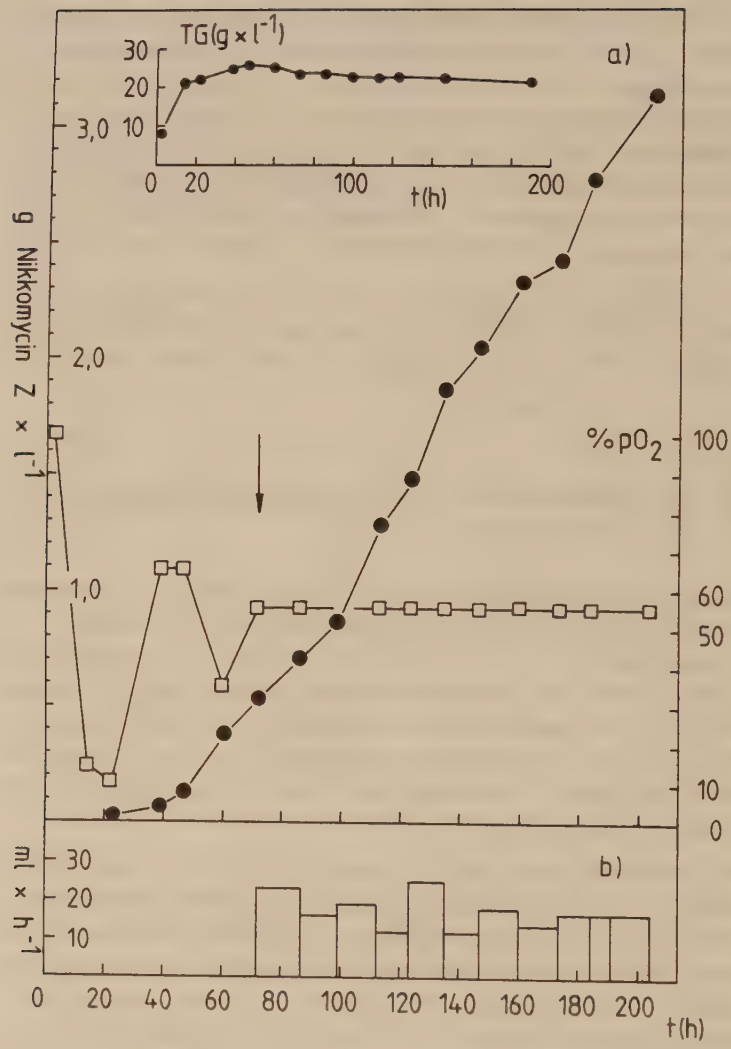


Abb. 21: pO_2-feeding-Fermentation zur selektiven Produktion von Nikkomycin Z.
a) ●—● TG (g/l); ●—● Nikkomycin Z (g/l); □—□ pO_2 (%)
b) feeding-Rate (ml/h)
Der feeding-Lösung war L-Leucin zugesetzt.

17. Isolierung von Nikkomycin Z

Die Isolierung von Nikkomycin Z erfolgte im wesentlichen nach der von Dehler (1979) beschriebenen Methode für die Isolierung des Nikkomycin Z,X-Gemisches. Da der Wirkstoffanteil jedoch wesentlich höher als bei seinen Aufarbeitungen lag und das Medium gleichzeitig, bedingt durch die lange Fermentationszeit, wesentlich stärker ausgelaugt war, konnte die Chromatographie an Amberlite IRC-84 fortgelassen werden. Das Eluat der Dowex 50 WX4 Säule wurde eingeengt, mit Ameisensäure auf pH 4,0 angesäuert und direkt auf SP-Sephadex C-25 aufgetragen. Mit 0,05 N Pyridin-Acetat Puffer wurde eluiert. Nach dem Einengen und Lyophilisieren wurden je Lauf 500 mg Lyophilisat in 1 - 2 ml Aqua bidest aufgenommen und an Biogel P2 (200 - 400 mesh) chromatographiert. Dabei konnten die Nikkomycine C, D, I, J und Spuren von X abgetrennt werden. Je Lauf wurden 140 - 160 mg reines Nikkomycin Z isoliert. Abbildung 22 zeigt das Elutionsprofil einer Biogel P2 Chromatographie.

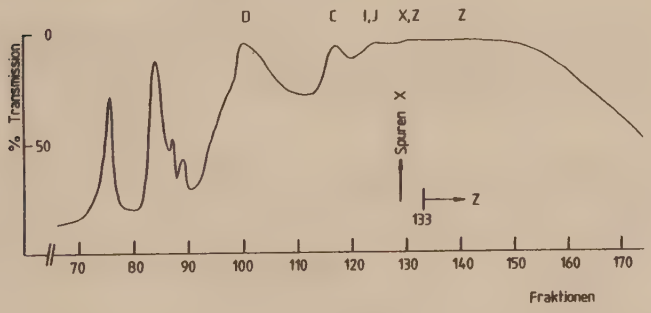


Abb. 22: Elutionsprofil der Chromatographie an Biogel P2 (200 - 400 mesh).
Die UV-Absorption wurde bei 280 nm gemessen. Die Peaks wurden mit Hilfe der HPLC charakterisiert.

18. UV- und IR-Spektren von Nikkomycin Z

Da X-freies Nikkomycin Z erstmals in großen Mengen isoliert werden konnte, wurde die Verbindung spektroskopisch näher charakterisiert.

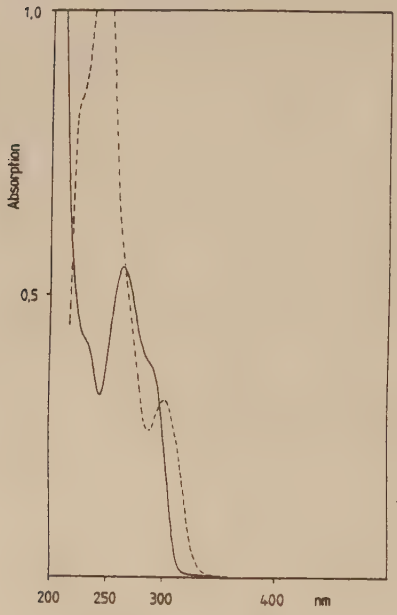


Abb. 23:
UV-Spektrum von Nikkomycin Z
Aufgenommen in O.1 N NaOH ---
und in O,1 N HCl ——

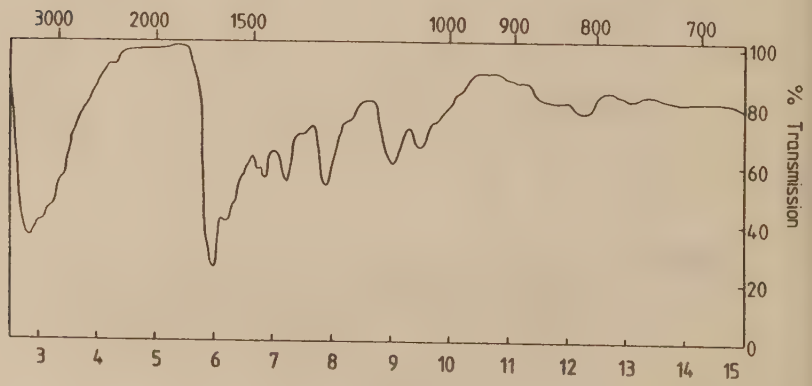


Abb. 24: IR-Spektrum von Nikkomycin Z.

19. Wirkungsspektrum - Vergleich Nikkomycin Z und X

In den früheren Untersuchungen konnte nur die biologische Aktivität eines Nikkomycin Z/X-Gemisches getestet werden (Höhne, 1974; Dehler, 1979).

Mit Hilfe der Uracil-auxotrophen Mutante Tü 901/172 gelang es, durch Fermentation allein Nikkomycin X herzustellen (Delzer, 1980)[1)].

Andererseits konnte durch gerichtete Fermentation X-freies Nikkomycin Z produziert werden (Abschnitt III.16.).

Es war nun von großem Interesse zu testen, ob zwischen den Nikkomycinen X und Z ein Unterschied in der biologischen Aktivität besteht und ob eventuell eine selektive Wirkung auf verschiedene Organismen zu finden ist.

Für das Wirkungsspektrum wurden Substanzen verwendet, die mit Hilfe der HPLC als rein charakterisiert waren. Mit Ausnahme von Bakterien, Hefen und den Sporen von Mucor hiemalis, die in den Agar eingegossen wurden, erfolgte die Bestimmung der MHK an der Riesenkolonie.

Bei der Auswertung wurde nicht nur auf eine Hemmung des Wachstums geachtet; morphologische Veränderungen der Pilzhyphen, wie Keulen- und Hexenbesenbildungen wurden ebenfalls berücksichtigt.

Wie erwartet, war auf Bakterien keine Wirkung zu beobachten. Escherichia coli, Bacillus brevis, Bacillus subtilis und Sarcina lutea wurden durch eine Konzentration von 100 µg/ml in keinem Fall gehemmt.

Die Ergebnisse des antifungischen Wirkungsspektrums sind aus Tabelle 4 zu ersehen. Bei den getesteten Pilzen lassen sich Unterschiede in der biologischen Wirkung von Nikkomycin Z und X feststellen. In acht Fällen ist Nikkomycin X

+) Herrn Delzer danke ich für die Überlassung von sauberem Nikkomycin X.

aktiver als Nikkomycin Z, wohingegen bei Alternaria kikuchiana, Colletrotrichum acutaxum und Corticium sasakii Z aktiver als X ist.

Tabelle 4: Antifungisches Wirkungsspektrum der Nikkomycine Z und X

Testorganismus	Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)	
	Nikkomycin Z	Nikkomycin X
Absidia spinosa	100	100
Alternaria kikuchiana	<0,5	0,5
Ascoidea rubescens	100	100
Ascophaera apis	>100	>100
Aspergillus flavus	>100	>100
Aspergillus fumigatus	100	100
Botrytis cinerea	5	<5
Candida albicans	50	50
Candida pulcherrima	10	10
Colletotrichum acutaxum	<0,5	0,5
Colletotrichum coccodes	10	5
Colletotrichum graminicola	5	5
Coprinus cinereus	100	100
Corticium sasakii	<0,5	0,5
Curvularia spec.	50	50
Debaryomyces hansenii	>100	>100
Drechslera oryzae	5	<5
Formitropsis marginatus	>100	>100
Fusarium spec.	100	100
Geotrichum candidum	5	<5
Microsporum gypseum	>100	>100
Mucor hiemalis	0,5	<0,5
Mucor mucedo (+)	<0,5	<0,5
Mucor mucedo (-)	0,5	<0,5
Mucor racemosus	5	<5

Fortsetzung Tabelle 4

Testorganismus	Minimale Hemmkonzentration µg/ml)	
	Nikkomycin Z	Nikkomycin X
Paecilomyces variotii	0,5	0,5
Rhodotorula rubra	>100	>100
Saccharomyces cerevisiae	>100	>100
Saprolegnia asterophera	>100	>100
Schizophyllum commune	100	100
Schizophyllum pombe	>100	>100
Sordaria macrospora	20	20
Torulopsis spec.	>100	>100
Trametes zonata	20	20
Trichophyton mentagrophytes	50	20
Venturia inaequalis	>100	>100

20. Weitere Untersuchungen zum Einfluß von verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Nikkomycin-Synthese

Wie in Abschnitt III.9. beschrieben, wurde bei Verfütterung von L-Leucin bzw. L-Isoleucin eine Stimulierung der Nikkomycinproduktion im resting-cell beobachtet. In diesem System wurden nun weitere Untersuchungen durchgeführt.

Abbildung 25 zeigt das Ergebnis einer Verfütterung von L-Isoleucin, D-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin. Die Aminosäuren wurden in einer Konzentration von 10 mMol/l eingesetzt. L-Isoleucin stimulierte die Nikkomycin X Bildung gegenüber der Kontrolle um +585 %, D-Isoleucin um +460 %, L-Leucin um +235 % und L-Valin um +170 %. Die Stimulierung durch L-Isoleucin war somit stärker als durch L-Leucin. Im Plattendiffusionstest konnte dies auf Grund der großen Ungenauigkeit bei der Ablesung nicht festgestellt werden;

dort waren L-Leucin und L-Isoleucin gleich gute Stimulatoren der Nikkomycinsynthese.

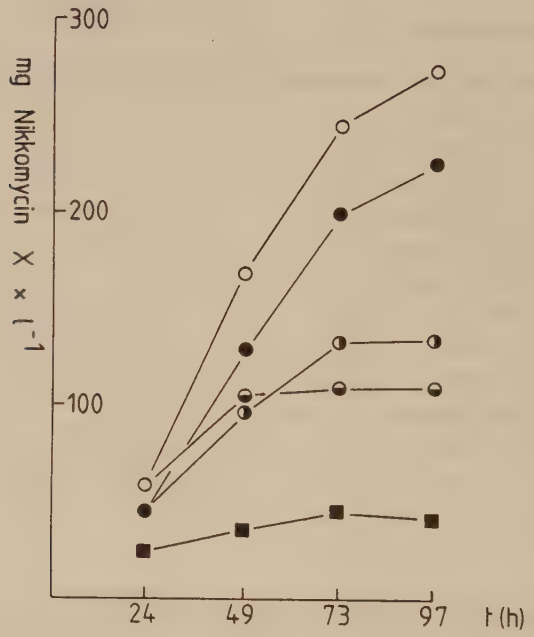


Abb. 25: Nikkomycin X Produktion bei Verfütterung verzweigkettiger Aminosäuren im resting-cell.
■—■ Kontrolle; ◒—◒ L-Valin, 10 mM;
◑—◑ L-Leucin, 10 mM; ●—● D-Isoleucin, 10 mM;
○—○ L-Isoleucin, 10 mM.

Vergleicht man die Nikkomycinproduktion im resting-cell bei der Kontrolle ohne Isoleucin und bei Verfütterung von Isoleucin, so läßt sich kein Unterschied im pH-Verlauf und im Trockengewicht beobachten (s. Abbildung 26).

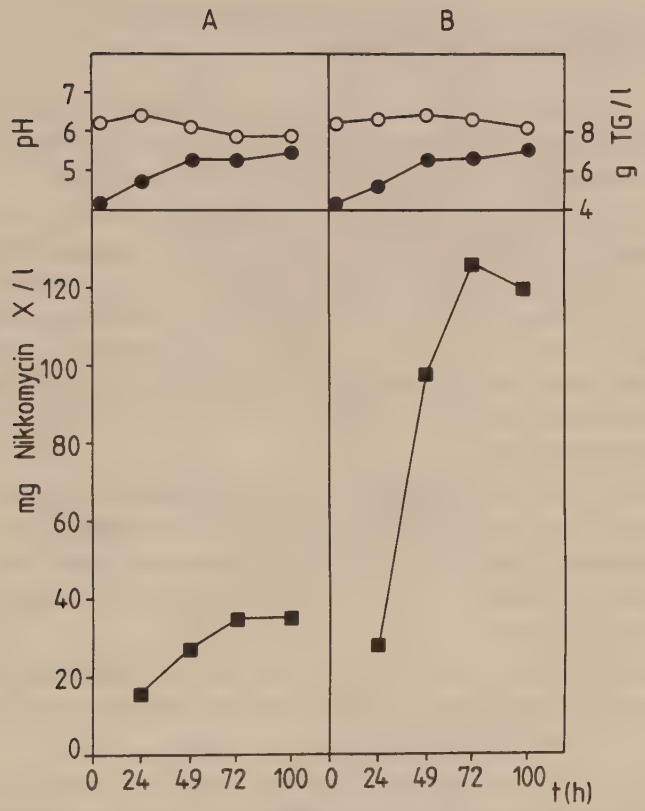


Abb. 26: Vergleich des Produktionsverlaufs ohne (A) und mit (B) L-Isoleucin, 10 mM, im resting-cell. ○—○ pH; ●—● gTG/l; ■—■ Nikkomycin X (mg/l).

21. Einbauversuch mit L-[U-^{14}C] Isoleucin, L-[U-^{14}C] Leucin und L-[U-^{14}C] Valin

Durch Anbieten von ^{14}C-markiertem L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin wurde untersucht, ob eine der drei stimulierenden Aminosäuren in die Nikkomycine eingebaut wird.

Da man annehmen kann, daß die Biosynthese des Nikkomycin C mit Uracil als Base gleich abläuft wie beim Polyoxin C und da bei der Biosynthese des Nikkomycin C mit 4-Formyl-4-imidazolin-2-on als Base ebenfalls keine Beteiligung einer der drei Aminosäuren zu erwarten ist (Langhärig, 1981), wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß eine der verzweigtkettigen Aminosäuren in das pyridinhaltige Nikkomycin D eingebaut wird.

Gestärkt wurde diese Hypothese durch die Tatsache, daß durch Abbau von L-Isoleucin bzw. L-Valin zu α-Methyl-β-hydroxybutyryl-CoA bzw. zu β-Hydroxy-isobutyryl-CoA Verbindungen entstehen, die mit Teilstrukturen von Nikkomycin D übereinstimmen.

Andererseits deutet die Stimulation der Nikkomycin-Synthese durch alle drei verzweigtkettigen Aminosäuren auf einen regulatorischen Effekt hin.

Sowohl die Biosynthese, als auch der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren läuft streckenweise über gemeinsame Enzyme ab (Lehninger, 1977; Massey et al., 1976).

^{14}C-markierte verzweigtkettige Aminosäuren wurden im resting-cell System Zellen aus der Produktionsphase angeboten. Jeder Ansatz enthielt 10 ml resting-cell Kultur, 10 mM/l der entsprechenden Aminosäure (unmarkiert) und je 25 µCi markierte Aminosäure. Nach 72 Stunden Inkubation auf der rotierenden Schüttelmaschine wurde das Kulturfiltrat gewonnen, auf DC-Platten chromatographiert und gescannt. In Abbildung 27 ist die Radioaktivitätsverteilung auf der Platte als Säulendiagramm dargestellt.

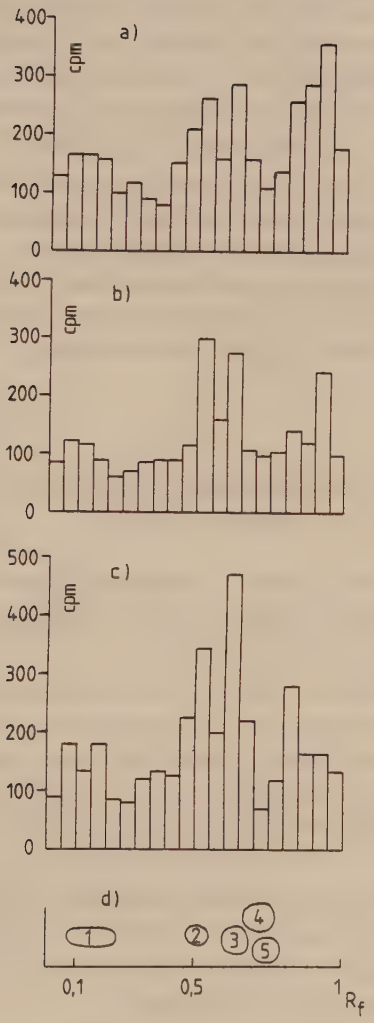


Abb. 27: Radioaktivitätsverteilung auf Cellulose-Platten nach Chromatographie von Kulturfiltrat aus resting-cell Versuchen in Gegenwart ^{14}C-markierter Aminosäuren.
a) ^{14}C-Valin; b) ^{14}C-Leucin; c) ^{14}C-Isoleucin;
c) R_f-Werte von Nikkomycin Z/X (1), Nikkomycin D (2), L-Valin (3), L-Isoleucin (4), L-Leucin (5).

Bei allen drei angebotenen verzweigtkettigen Aminosäuren ergab sich nur ein geringer Einbau in die Nikkomycine Z/X und D. Geringfügig war der Einbau von ^{14}C-Isoleucin höher als der von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Valin. Zieht man den background von 100 cpm ab, so ergibt sich ein maximaler Einbau bei ^{14}C-Isoleucin ins Nikkomycin D von 0,6 %.

Auf Grund der nicht eindeutigen Spezifität des ^{14}C-Einbaus ist eine Beteiligung einer der drei verzweigtkettigen Aminosäuren an der Biosynthese von Nikkomycin D unwahrscheinlich. Vielmehr scheinen die Aminosäuren L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin in die Regulation der Nikkomycin-Biosynthese direkt oder indirekt einzugreifen.

22. pO_2-feeding-Fermentationen mit L-Isoleucin resp. L-Leucin in der feeding-Lösung

Im resting-cell war durch L-Isoleucin eine höhere Stimulierung der Nikkomycin-Synthese erreicht worden als mit L-Leucin.

Unter den in Abschnitt III.10. beschriebenen Bedingungen wurden daher zwei parallele pO_2-feeding-Fermentationen durchgeführt. Die feeding-Lösung war beim einen Fermenter mit L-Isoleucin, beim anderen mit L-Leucin supplementiert. Es wurde in beiden Fällen bei einem pO_2-Sollwert von 45 % gefeedet.

Das Ergebnis ist aus Abbildung 28 ersichtlich. Durch Supplementierung der feeding-Lösung mit L-Isoleucin anstelle von L-Leucin wurde eine Ausbeutesteigerung zur 193. Fermentationsstunde von +13 % erreicht.

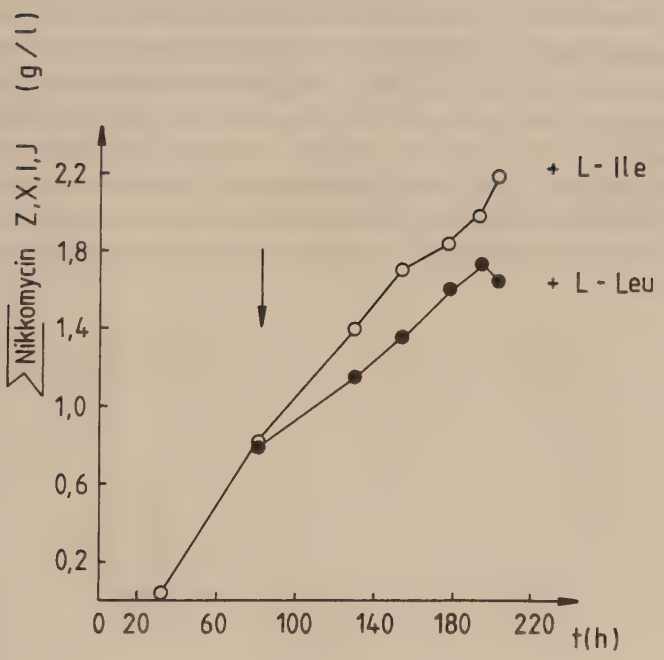


Abb. 28: Nikkomycin-Produktionskurven zweier pO_2-feeding Fermentationen. Im einen Fall war die feeding-Lösung mit L-Isoleucin, im anderen mit L-Leucin supplementiert.
○—○ L-Isoleucin; ●—● L-Leucin;
Der Pfeil markiert den feeding-Beginn.

23. Zusatz von L-Isoleucin zu verschiedenen Zeitpunkten

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Schüttelkulturen auf komplexem Medium L-Isoleucin in einer Konzentration von 70 mMol pro Liter angeboten. Das Ergebnis zeigt Abbildung 29. Die Kontrolle ohne Zusatz von L-Isoleucin produzierte Nikkomycin X bis zur 120. Stunde. Gibt man in der 48. Stunde L-Isoleucin zur Kultur, so verzögert sich der Beginn der Produktionsphase um ungefähr 24 Stunden. Eine Zugabe von L-Isoleucin in der 72. Stunde bewirkt hingegen eine

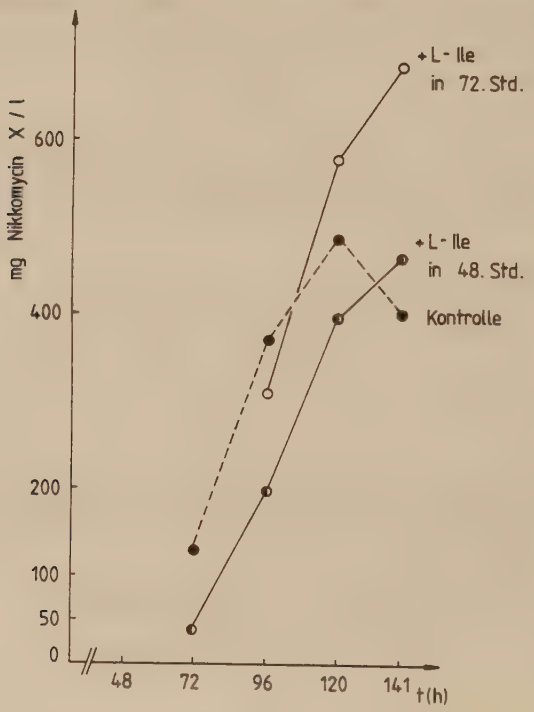


Abb. 29: Nikkomycin X Produktion in Schüttelkultur nach Supplementierung des komplexen Mediums mit L-Isoleucin zu verschiedenen Zeitpunkten.
●---● Kontrolle - ohne L-Ile Zugabe
◐—◐ L-Ile Zugabe nach 48 Stunden
○—○ L-Ile Zugabe nach 72 Stunden

deutliche Verlängerung der Nikkomycin-Produktbildungsphase bei hoher Produktbildungsgeschwindigkeit. Vergleicht man die maximalen Ausbeuten allein an Nikkomycin X, so ergibt sich eine Steigerung von +39 % gegenüber der Kontrolle.

Zwecks Reproduzierung dieses Ergebnisses unter standardisierteren Bedingungen wurden zwei 20 l batch-Fermentationen durchgeführt. Einem Fermenter wurden in der 80. Stunde 40 mMol pro Liter L-Isoleucin zudosiert. Der andere Fermenter lief als Kontrolle unverändert weiter. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 30 zu sehen. Bei dem mit

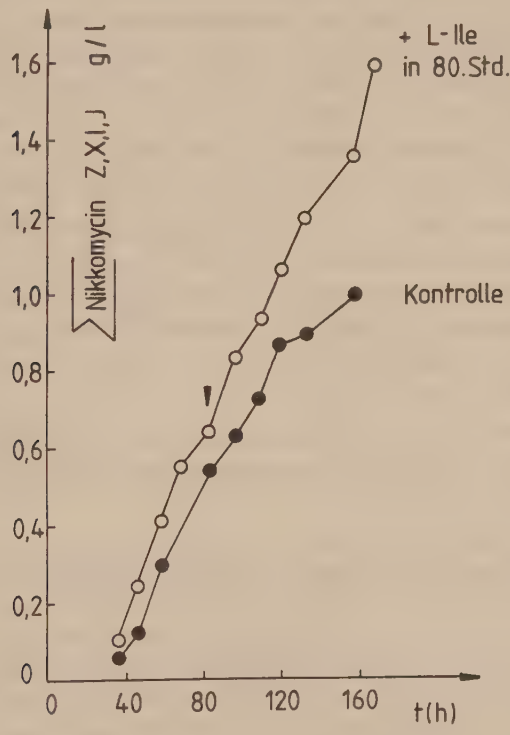


Abb. 30: Nikkomycin-Produktion in parallelen batch-Fermentationen ohne und mit L-Isoleucin Zusatz (40 mMol pro Liter) in der 80. Stunde. Es wurde jeweils die Summe der Nikkomycine Z, X, I, J ermittelt (g/l).
●—● Kontrolle - kein Zusatz von L-Ile
○—○ L-Ile Zusatz in der 80. Stunde

L-Isoleucin supplementierten Fermenter konnte gegenüber dem Kontrollfermenter eine Ausbeutesteigerung von +35 % an Nikkomycin Z, X, I, J bis zur 160. Stunde erreicht werden. Die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit wurde in Gegenwart von L-Isoleucin bis zur 170. Stunde aufrechterhalten.

24. Einzel- und Kombinationsverfütterungen im resting-cell

Die Biosynthese von L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin ist eng mit der Biosynthese der Aminosäuren L-Lysin, L-Threonin und L-Methionin verknüpft. Durch Verfütterung dieser Metabolite im resting-cell sollte Auskunft über deren mögliche direkte oder indirekte Beteiligung an der Nikkomycin-Synthese gewonnen werden. Das Ergebnis dieser Verfütterungsexperimente ist aus Tabelle 5 zu ersehen.

Deutlich wurde erneut die Stimulierung der Nikkomycin X Synthese durch L-Isoleucin. Die Vorstufen von L-Isoleucin, die Aminosäuren L-Homoserin und L-Threonin, lagen im Bereich der Kontrolle. Ebenso im Bereich der Kontrolle lag L-Lysin. Überraschenderweise hemmte L-Methionin die Nikkomycin X Synthese um -60 %.

Bei den Kombinationsverfütterungen konnte in keinem Fall eine Steigerung über die Stimulierung von L-Isoleucin hinaus erreicht werden.

Die Verfütterung von Ribose, zwecks Stimulierung des Pentosephosphatzyklus, brachte keine Steigerung der Nikkomycinbildung.

L-Tryptophan bzw. seine Abbauprodukte Chinolinsäure und Nicotinsäure könnten als potentielle Vorstufen der pyridinhaltigen Nikkomycinaminosäure angesehen werden. Deren Verfütterung brachte jedoch ebenfalls keine Stimulierung der Nikkomycin-Synthese.

Ergebnisse mit histidinauxotrophen Mutanten deuten darauf

Tabelle 5: Einzel- und Kombinationsverfütterungen von L-Aminosäuren aus der Pyruvat-Biosynthese-Familie. Die Nikkomycin X Bildung wurde mit Hilfe der HPLC nach 96 Stunden Inkubation ermittelt.

	mMol Supplement pro Liter	mg Nikkomyxin X pro Liter	rel. Produktion
Kontrolle	0	96	1
L-Isoleucin	10	180	1,9
L-Leucin	10	138	1,4
L-Valin	10	128	1,3
L-Lysin	10	86	0,9
L-Threonin	10	96	1
L-Homoserin	10	92	1
L-Methionin	10	40	0,4
L-Isoleucin + L-Leucin + L-Valin	10+10+10	150	1,6
L-Isoleucin + L-Lysin + L-Threonin	10+5+5	192	2
L-Lysin + L-Threonin	5+5	90	0,9
L-Isoleucin + L-Threonin	10+10	190	2

hin, daß die Nikkomycin Base 4-Formyl-4-imidazolin-2-on über den Histidinbiosyntheseweg gebildet wird (Langhärig, 1980). In Verfütterungsexperimenten konnte er zeigen, daß die Fähigkeit zur Nikkomycin X Produktion bei diesen Mutanten durch Histidinol wiederhergestellt werden kann. Entsprechend konnte er durch Histidinol-Verfütterung beim Wildtyp die Nikkomycin X Bildung stimulieren.

In Abbildung 31 ist das Ergebnis einer Einzel- und Kombinationsverfütterung mit L-Isoleucin und Histidinol darge-

stellt. Es wurde jeweils eine Konzentration von 10 mMol pro Liter eingesetzt. Die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit lag bei L-Isoleucin Supplementierung höher als bei der mit Histidinol. Durch gleichzeitiges Anbieten von L-Isoleucin und L-Histidinol konnte die Nikkomycin X Synthese bei hoher Produktbildungsgeschwindigkeit bis zur 100. Stunde aufrechterhalten werden. Dies zeigt, daß die Verfütte-

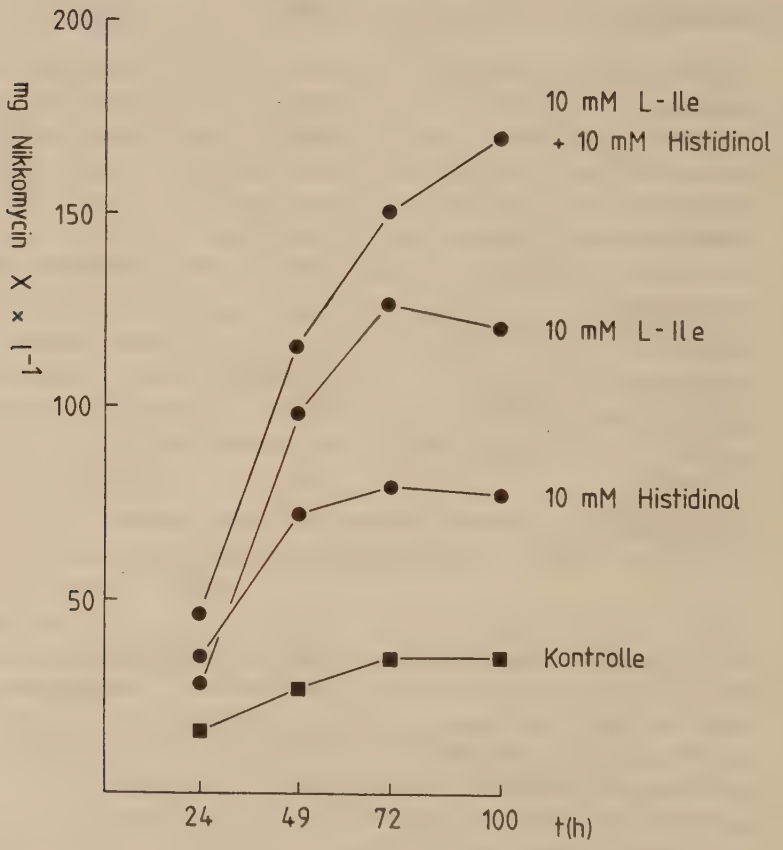


Abb. 31: Einzel- und Kombinationsverfütterung mit L-Isoleucin und Histidinol im resting-cell beim Wildtyp.

rung der Basenvorstufe Histidinol und die wahrscheinlich regulatorische Wirkung von L-Isoleucin sich bei der Stimulierung der Nikkomycinbildung positiv ergänzen.

25. Aminosäurepool-Bestimmung

In der Literatur sind zahlreiche Fälle beschrieben, in denen der Pool einzelner Aminosäuren in direktem Zusammenhang steht mit der Biosynthese eines Antibiotikums.

Beispielsweise ist der L-Methionin-Pool vor Beginn der Cephalosporin C Biosynthese bei Cephalosporium acremonium erhöht (Matsumura et al., 1980). Obwohl L-Methionin nicht als Schwefeldonor der Cephalosporin C Synthese gilt, brachte L-Methionin eine Ausbeutesteigerung. L-Methionin hat somit eher eine regulatorische Funktion.

Für die Bildung von Neomycin bei Streptomyces fradiae scheint andererseits ein erhöhter Glutamat-Pool notwendig zu sein (Okazaki et al., 1973).

Wie in Abschnitt III.20. beschrieben, wird die Biosynthese der Nikkomycine direkt oder indirekt durch L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin stimulierend beeinflußt. Um mehr über den physiologischen Zustand im Produzenten während der Nikkomycinbildung zu erfahren, wurde eine Bestimmung des Aminosäurepools zu verschiedenen Zeitpunkten auf dem Produktionsmedium 4 durchgeführt. Die Aminosäureanalyse erfolgte wie in Abschnitt II.9. beschrieben. Das Ergebnis ist aus Abbildung 32 zu ersehen.

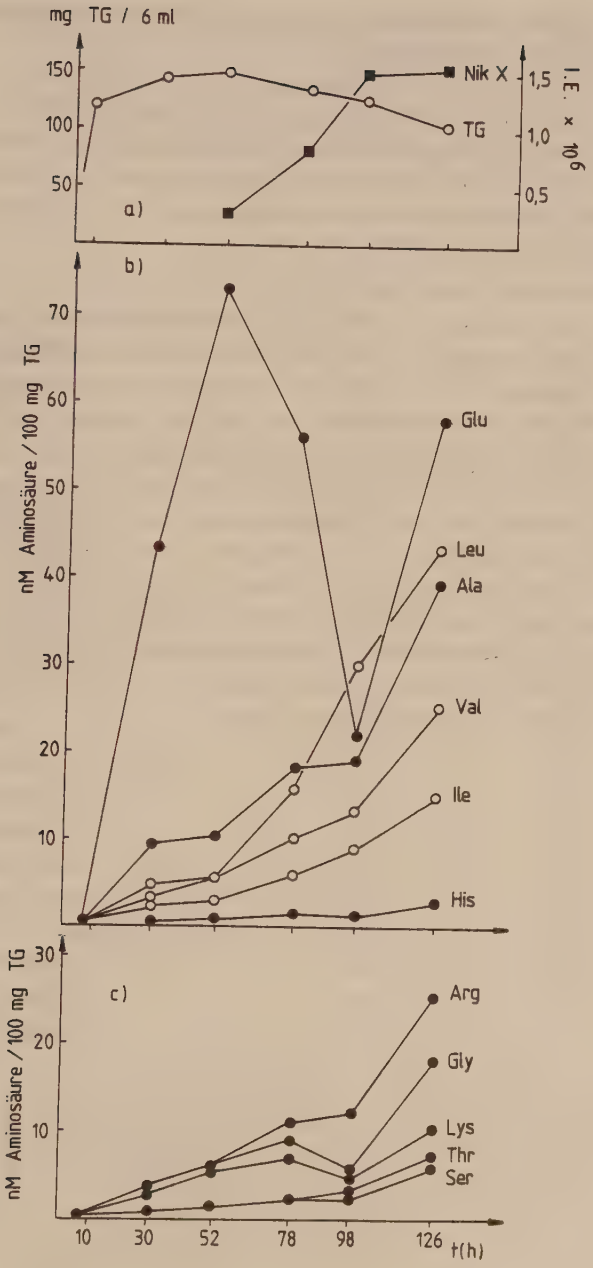
Zu Beginn liegt der Glutamat-Pool sehr hoch, wie dies auch für andere Streptomyceten beschrieben wurde (Langheinrich and Ring, 1976). Glutamat ist Schlüsselmetabolit für Transaminierungsreaktionen zur Synthese anderer Aminosäuren. Nach der 52. Stunde fällt die Glutamat-Konzentration wieder ab, um nach der 98. Stunde erneut anzusteigen. Parallel zum Absinken des Glutamat-Pools ist das Wachstum

beendet und die Nikkomycin-Produktion beginnt. Während der Nikkomycin-Produktionsphase ab der 52. bis zur 98. Stunde steigen die Pools der Aminosäuren Alanin, Leucin, Valin, Isoleucin und Arginin stark an. Die Pools von Glycin, Lysin, Threonin, Serin und Histidin bleiben mehr oder weniger konstant. Andere Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cystein sind nicht nachweisbar (<0,5 nMol Aminosäure/100 mg TG). Aspartat ist nur in der 98. Stunde am Ende der Nikkomycinbildungsphase in geringen Konzentrationen detektierbar, ebenso Methionin. Der starke Anstieg der Pools gegen Ende der Nikkomycinbildungsphase ab der 98. Stunde könnte durch beginnende Lyse und Freisetzung von Aminosäuren durch proteolytische Enzyme erklärt werden.

Überraschend ist vor allem der sehr hohe L-Leucin Pool in den Zellen von Tü 901/8c während der Produktionsphase. Verglichen mit den anderen Pools, die aromatischen Aminosäuren waren beispielsweise noch nicht einmal detektierbar, liegen die Konzentrationen von L-Valin und L-Isoleucin ebenfalls hoch. Dies ist umso erstaunlicher, da durch Zudosierung von L-Isoleucin gegen Ende der Nikkomycinbildungsphase eine Verlängerung der Nikkomycinproduktion erreicht wird (s. Abschnitt III.23.).

Der Pool an verzweigtkettigen Aminosäuren scheint somit einen wichtigen Faktor für den Ablauf der Nikkomycin-Biosynthese darzustellen.

Abb. 32: Aminosäure-Pool und Nikkomycin X Produktion untersucht im Schüttelkolben auf komplexem Medium 4. Die Konzentration der Aminosäuren wurde auf 100 mg TG umgerechnet.
a) Wachstumskurve und Nikkomycin X Bildung
b) Pool der Aminosäuren: Glutaminsäure, Leucin, Alanin, Valin, Isoleucin, Histidin
c) Pool der Aminosäuren: Arginin, Glycin, Lysin, Threonin, Serin
Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Cystein waren in so geringen Spuren vorhanden, daß sie vom Analysator nicht detektiert wurden. Asparagin und Methionin wurden ab der 98. Stunde in geringen Mengen nachgewiesen.


mg TG / 6 ml
150
100
50
a)
Nik X
TG
1,5
1,0
0,5
I.E. x 10⁶
b)
nM Aminosäure / 100 mg TG
70
60
50
40
30
20
10
Glu
Leu
Ala
Val
Ile
His
c)
nM Aminosäure / 100 mg TG
30
20
10
Arg
Gly
Lys
Thr
Ser
10
30
52
78
98
126
t(h)

26. Verfütterung von Strukturanalogen der verzweigtkettigen Aminosäuren

Im resting-cell wurden diverse Strukturanaloge der verzweigtkettigen Aminosäuren verfüttert, um deren Wirkung auf die Nikkomycin X Bildung zu untersuchen (s. Tabelle 6). Es wurde jeweils eine Konzentration von 10 mMol pro Liter angeboten.

Aus dem Versuch kann abgeleitet werden, daß die negative Ladung der freien Carboxylgruppe von L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin essentiell für die stimulierende Wirkung dieser Aminosäuren ist. Isoleucinol, Leucinol und Valinol, bei denen die Carboxylgruppe zur $-CH_2OH$ Gruppe reduziert ist, stimulierten die Nikkomycin-Synthese nicht. Isoleucinhydroxamat hemmt sogar die Nikkomycin Bildung. Bei dieser Verbindung ist die Carboxylgruppe durch eine Hydroxamgruppierung blockiert. Isoleucinamid und Isoleucinmethylester wirken ähnlich stimulierend wie Isoleucin; dies ist wahrscheinlich auf eine Spaltung dieser Verbindungen zum Isoleucin zurückzuführen. Strukturanaloge mit einen aliphatischen nicht verzweigten bzw. einem cyclischen Aminosäurerest wirken nur leicht stimulierend.

Tabelle 6: Wirkung verschiedener Antagonisten und Analoga der verzweigten Aminosäuren auf die Nikkomycin X Bildung. Die Untersuchungen wurden im resting-cell System in Gegenwart von je 10 mM/l Supplement durchgeführt.[1)] Die Nikkomycin X Produktion nach 73 Stunden Inkubation wurde mit Hilfe der HPLC ermittelt.

	mg Nikkomycin X $\cdot l^{-1}$	rel. Produktion
Kontrolle ohne Supplement	47	1
L-Isoleucin	244	5,2
D-Isoleucin	200	4,3
L-Leucin	134	2,9
L-Valin	110	2,3
Cyclohexanglycin	95	2,0
2-Aminoisobutyrat	67	1,4
DL-C-Allylglycin	95	2,0
Na-2-DL-Methylbutyrat	31	0,7
L-Isoleucinol · HCl	52	1,1
L-Leucinol · HCl	41	0,9
L-Valinol · HCl	55	1,2
L-Norleucin	91	1,9
L-Isoleucinhydroxamat	13	0,3
2-Hydroxyisovaleriat	110	2,3
L-Valinamid	60	1,3
L-Isoleucinmethylester	266	5,7
L-Isoleucinamid	218	4,6
DL-Norvalin	120	2,6
2-Hydroxyisobutyrat	60	1,3
N-Methyl-L-Valin	50	1,1
L-allo-Isoleucin	152	3,2

[1)] Ein großer Teil dieser Verbindungen wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. K. Poralla zur Verfügung gestellt.

27. Einfluß einer schnell verwertbaren N-Quelle auf die Nikkomycin-Bildung

Bei Versuchen zur Ausbeuteverbesserung im resting-cell war aufgefallen, daß durch Erhöhung der Asparaginkonzentration eine Senkung der Nikkomycinbildung erfolgte. Gleichzeitig wurde eine geringere Stimulierung der Nikkomycin X Synthese durch L-Isoleucin beobachtet.

In Abbildung 33 ist das Ergebnis einer Untersuchung des Einflusses von L-Asparagin auf die Nikkomycin-Bildung im resting-cell dargestellt. Deutlich ist eine Reprimierung der Nikkomycin X Synthese in Gegenwart erhöhter Asparaginkonzentrationen zu erkennen.

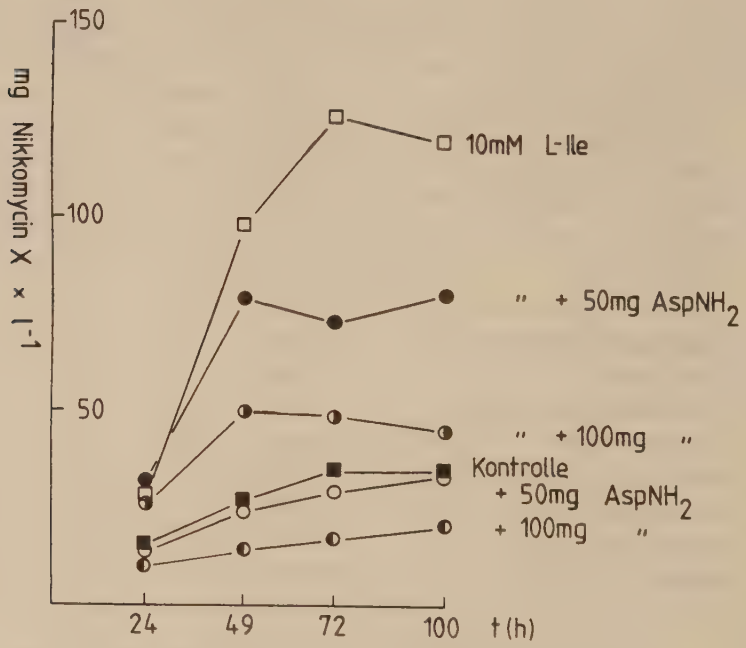


Abb. 33: Nikkomycin X Synthese in Gegenwart unterschiedlicher Asparaginkonzentrationen mit und ohne Zusatz von L-Isoleucin im resting-cell.

In vielen Veröffentlichungen ist der Einfluß von NH_4-Ionen bzw. von schnell verwertbaren N-Quellen auf die Aktivität von Enzymen beschrieben, und es häufen sich die Erkenntnisse, wonach auch die Antibiotika-Bildung einer Stickstoff-Regulation unterliegt (Aharonowitz and Demain, 1979; Aharonowitz and Friedrich, 1980; Gräfe et al., 1979).

IV. DISKUSSION

Trotz der Vielfalt der Biosynthesewege sekundärer Stoffwechselendprodukte werden diese Verbindungen von einigen wenigen Schlüsselintermediärmetabiliten abgeleitet. Die meisten Antibiotika stammen, entsprechend ihrer Struktur und ihrer Biosynthese, von einer oder mehreren Gruppe(n) von Metaboliten ab: den Nukleotiden, den Aminosäuren, den Zuckern, Acetyl-CoA und/oder Mevalonsäure bzw. verwandten Verbindungen inklusive Zwischenprodukten des Citrat-Zyklus (Rose, 1979).

Regulationsmechanismen beeinflussen direkt das Pool-Niveau dieser End- und Zwischenprodukte des Primärstoffwechsels, welcher die Vorstufen für den Sekundärstoffwechsel liefert. Der Pool an vorhandenen Vorstufen ist der Hauptverknüpfungspunkt zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel (Aharonowitz und Demain, 1980).

Bei den meisten Antibiotika-batch-Fermentationen findet man eine typische Tropophase-Idiophase Folge bei Verwendung komplexer Medien, die ein schnelles Wachstum ermöglichen. Der Faktor, welcher den Beginn der Antibiotika-Synthese auslöst, ist wahrscheinlich eine wachstumslimitierende Komponente (Martin und Demain, 1980). Bei Erschöpfung dieses Faktors ist das Wachstum beendet und die Antibiotikabildung beginnt.

Über den eigentlichen Mechanismus dieses Prozesses hat man bisher nur wenig Vorstellungen, zumal die Biosynthese der meisten Antibiotika noch gar nicht bzw. unvollständig aufgeklärt ist.

Bei der Nikkomycin-Fermentation wurde sowohl auf komplexem Medium als auch auf definiertem Medium, unter den gegebenen Fermentationsbedingungen, die Trennung des Fermentationsverlaufs in eine Tropo- und eine Idiophase beobachtet (s. Abbildung 7 und 10). Wie bei vielen Antibiotika-

Fermentationen scheint auch beim Nikkomycinproduzent Streptomyces tendae der das Wachstum limitierende Faktor Phosphat zu sein.

Die zeitliche Trennung von Tropo- und Idiophase ist bei Antibiotika-Fermentationen keine Notwendigkeit. Durch Änderung der Fermentationsbedingungen, vor allem des Mediums, läßt sich eine Produktion von sekundären Metaboliten auch während des Wachstums erreichen. Vorzugsweise werden hierzu Medien eingesetzt, die nur ein langsames Wachstum erlauben. Bei Streptomyces clavuligerus, einem Cephalosporin Produzenten, wurde bei Verwendung von Succinat oder α-Ketoglutarat als C-Quelle eine Vermischung von Tropo- und Idiophase beobachtet (Aharonowitz und Demain, 1978). Im Glucose-limitierten Chemostaten wurde früher schon bei exponentiell-wachsenden steady-state Kulturen von Penicillium chrysogenum eine Penicillin-Produktion beschrieben (Pirt und Righelato, 1967).

Bei vielen Antibiotika-Prozessen hat man einen negativen reprimierenden Einfluß schnell verwertbarer C-Quellen auf die Produktbildung festgestellt. Dieser Effekt wurde als C-Katabolit-Regulation bezeichnet. In einem Medium, das Glucose und eine andere C-Quelle enthält, wird zunächst die Glucose verbraucht, ohne daß Antibiotika produziert werden. Nach Erschöpfung der Glucose wird die zweite, nicht die Produktion reprimierende C-Quelle verwertet. Der molekulare Mechanismus dieses "Glucose-Effektes" ist bisher nur in wenigen Fällen bekannt. So entsteht die Glucose-Inhibition der Actinomycin-Produktion durch Repression der Phenoxazinon-Synthase, einem Schlüsselenzym in der Bildung von Actinomycin. Galaktose wirkt nicht reprimierend (Gallo und Katz, 1972). Die Bildung von o-Demethylpuromycin-methyltransferase, dem letzten Enzym der Puromycin-Biosynthese, wird durch Glucose, jedoch nicht durch Glycerin gehemmt (Sankaran und Pogell, 1975).

Bisher konnte noch nicht bewiesen werden, daß die Kohlenstoff-Katabolit-Regulation der Antibiotika-Synthese durch

c-AMP vermittelt wird. Exogen angebotenes c-AMP bewirkt zwar eine Inhibition der Candicidin-Synthese, dies scheint jedoch ein P_i vermittelter Effekt zu sein (Martin und Demain, 1977).

Ebenso konnte bei Streptomyces griseus kein direkter Zusammenhang zwischen intracellulärer c-AMP Konzentration, Katabolit-Regulation und Streptomycin-Produktion gefunden werden (Ragan und Vining, 1978).

Neben einer Repression von Antibiotika-Synthetasen ist in einigen Fällen eine Inhibition von Antibiotika-bildenden Enzymen durch Glucose beschrieben worden (Demain und Kennel, 1978).

Der reprimierende Effekt von Glucose läßt sich durch langsames Zudosieren dieser C-Quelle in geringer Konzentration beseitigen (Martin und McDaniel, 1974).

Dies zeigt, daß die Phase, in der ein Produkt synthetisiert wird, in vielen Fällen nicht eine Funktion des spezifischen Moleküls ist, sondern nur die spezifischen Bedingungen des Nährstoffangebotes der Umgebung, in der ein Mikroorganismus wächst, widerspiegelt.

Wie aus Abbildung 10 zu ersehen ist, wird das Ende der Tropophase bei der Nikkomycin-Fermentation auf komplexem Medium durch einen Phosphatmangel hervorgerufen. Haupt-C-Quelle während dieser Phase ist Stärke. Die Stärke wird vor Beendigung der Wachstumsphase aufgebraucht, und der Organismus beginnt mit dem langsamen Abbau von Mannit. Mannit stellt die C-Quelle für die Tropophase dar.

Anorganisches Phosphat reguliert bei vielen Antibiotika-Produzenten als wichtiger wachstumslimitierender Faktor den Beginn der Antibiotika-Produktion (Martin, 1977). So ist die Phosphat-Konzentration zwei Stunden vor Beginn der Candicidin-Synthese erschöpft (Liras et al., 1977). Phosphat inhibiert auch die Candicidin-Synthese, nachdem sie schon begonnen hat (Martin and Demain, 1976). Die

Streptomycin-Phosphatase, ein Idiophaseenzym, welches nur in Streptomycin-Produzenten vorhanden ist, wird durch anorganisches Phosphat inhibiert, jedoch nicht reprimiert (Walker and Walker, 1971). Küenzi (1980) konnte zeigen, daß bei der Cephalosporin-Synthese bei Cephalosporium acremonium in Gegenwart erhöhter Phosphat-Konzentrationen ein schnellerer Verbrauch von C- und N-Quelle auftrat. Gleichzeitig wurde das Wachstum beschleunigt und die Cephalosporin-Bildung reduziert. Die Sensitivität der Cephalosporin-Produktion auf P_i war jedoch nur nachweisbar, wenn C-Quelle im Überschuß vorlag. In Gegenwart hoher Phosphatkonzentrationen konnte durch Kontrolle des Glucose-Verbrauchs durch ein feeding-Verfahren eine gute Produktion erreicht werden. P_i scheint somit nicht die Cephalosporin-Synthese direkt zu inhibieren (≠ Candicidin).

Von Martin et al. (1979) wurde eine Methode zum schnellen Auffinden von Mutanten beschrieben, die in der Phosphat-Kontrolle der Antibiotika-Synthese dereguliert sind.

Auf einem definierten Medium konnte gezeigt werden, daß die Nikkomycin-Produktion einer Kontrolle durch Phosphationen unterliegt. Gibt man Phosphat während der Produktionsphase, so wird ebenfalls eine Reprimierung der Nikkomycin-Produktion festgestellt. Keckeisen (1979) beschrieb eine durch P_i-Ionen katalysierte Spaltung der aktiven Nikkomycine. In einem solchen Fall hätte die Konzentration an Nikkomycin C und D nach der Phosphatgabe ansteigen müssen. Dies wurde jedoch nicht beobachtet (unveröffentlichtes Ergebnis). Die Hemmung durch Phosphat-Ionen hat somit physiologische Ursachen.

Auf dem Produktionsmedium hörte die Nikkomycin-Bildung ungefähr nach 110 Stunden Fermentationszeit auf. Die Analyse ergab, daß zu diesem Zeitpunkt die Phosphatkonzentration im Medium erschöpft war. C- und N-Quelle waren noch ausreichend vorhanden. Hierfür gab es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

1. Phosphatmangel bringt die Nikkomycin-Synthese zum Stop-

pen. - Dies konnte durch Zudosierung von P_i ausgeschlossen werden.

2. Nikkomycine hemmen im feedback ab einer bestimmten Konzentration ihre Eigensynthese.
3. Nikkomycine wirken ab einer bestimmten Konzentration toxisch auf den Produzenten. - Dies konnte im Plattendiffusionstest ausgeschlossen werden. Bis zu einer Nikkomycin Z,X Konzentration von 10 g pro Liter trat keine Wachstumshemmung des Produzenten Tü 901 auf (unveröffentlichtes Ergebnis).
4. Mannit stellt eine zu langsame C-Quelle für die Produktionsphase dar. - Durch Zudosierung von Glucose und einer N-Quelle in einem phosphatlimitierten pO_2-feeding-Prozeß konnte tatsächlich die Produktbildungsphase verlängert werden, jedoch trat nach der 140. Stunde erneut ein Absinken der maximalen Produktbildungsgeschwindigkeit auf. Dies wurde auf eine nicht optimale Zusammensetzung der feeding-Lösung zurückgeführt.

Um ein langwieriges Durchtesten verschiedener feeding-Lösungen im Fermenter zu vermeiden, wurde nach einer Methode gesucht, die eine schnellere Optimierung ermöglichen sollte. Für Untersuchungen in der Idiophase wurde ein phosphatlimitiertes, pH-statisches resting-cell System entwickelt, in dem die Wirkung von Primärmetaboliten auf die Nikkomycin-Synthese untersucht wurde.

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Versuche lagen noch keine Informationen über die Biosynthese der pyridinhaltigen Nikkomycinaminosäure D vor. Aus diesem Grund wurden sämtliche üblichen L-Aminosäuren im resting-cell dem Produzentenstamm Tü 901 angeboten. Im günstigsten Fall sollten folgende Informationen anfallen:

a) Aminosäuren, die einen limitierenden Faktor der Nikkomycin-Synthese darstellen, sollten eine Steigerung der Produktion bewirken.
b) Aminosäuren, die einen anfänglichen Biosyntheseweg mit Nikkomycin D bzw. Z/X gemeinsam haben, könnten durch Auslösung eines feedback-Mechanismus eine Hemmung der

Produktion bewirken.

c) bestimmte Aminosäuren oder deren Abbauprodukte könnten eine induzierende bzw. stimulierende Wirkung auf die Nikkomycin-Bildung ausüben.

In der Literatur ist die Beteiligung von L-Aminosäuren an der Biosynthese von Antibiotika,bzw. an deren Regulation, schon in zahlreichen Fällen beschrieben.

So stimuliert Phenylalanin die Anthramycin-Produktion bei Streptomyces refuineus. Phenylalanin inhibiert über einen feedback die Prephenat-Dehydrogenase. Daraus folgt, daß Prephenat zu Tyrosin abfließt, welches zur Biosynthese von Anthramycin gebraucht wird (Speedie and Park, 1980).

Bei der Penicillin-Synthese wird durch Lysin ein feedback auf das 1. Enzym der gemeinsamen Biosynthese, der Homocitrat-Synthetase, ausgelöst, so daß α-Aminoadipinsäure nicht mehr in ausreichender Konzentration für die Penicillin-Synthese zur Verfügung steht (Demain and Masurekar, 1974).

Bei der Candicidin-Synthese bewirkt Tryptophan eine Inhibierung der p-Aminobenzoesäure-Synthase und somit kann in Gegenwart hoher Tryptophan-Konzentrationen die Candicidin-Synthese nicht ablaufen (Gil et al., 1980). Man bezeichnet diese Hemmung auch als "cross-feedback"-Regulation oder "metabolic interlock", da durch das Endprodukt eines Synthesewegs ein anderer Syntheseweg mit abgedreht wird.

Die Verfütterungsexperimente im resting-cell brachten für die Nikkomycin-Produktion folgende Ergebnisse (HPLC-Daten): L-Isoleucin stimulierte die Nikkomycin-Bildung um +585 %, L-Leucin um +235 % und L-Valin um +170 %. L-Methionin hemmte die Nikkomycin-Bildung um -60 %. Alle anderen Aminosäuren lagen im Bereich der Kontrolle. Ebenfalls im Bereich der Kontrolle lagen die potentiellen Vorstufen der pyridinhaltigen Nikkomycinaminosäure D: Chinolinsäure, Nicotinsäure, Nicotinsäureamid und L-Tryptophan.

Nach Supplementierung der feeding-Lösung mit L-Leucin konn-

im pO_2-feeding-Prozeß erneut eine Ausbeutesteigerung erreicht werden. Zwar war es nicht gelungen, die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit zu steigern, jedoch konnte die Produktionsphase, bei gleicher Bildungsgeschwindigkeit, von 70 Stunden im batch-Ansatz auf 200 Stunden verlängert werden. Die Ausbeute an biologisch aktiven Nikkomycinen Z, X, I, J wurde gegenüber dem batch-Ansatz von 0,7 g/l nach 110 Stunden auf 3,15 g/l nach 310 Stunden gesteigert.

Mit Hilfe eines pO_2-feedings ist es somit möglich, die Fähigkeit des Stammes Tü 901 zur Nikkomycin-Bildung erheblich, über die Dauer eines batch-Ansatzes hinaus, zu erhalten. Durch das feeden unter phosphatlimitierten Bedingungen wurde kein Wachstum induziert. Sowohl die Biomasse als auch die Produktbildungsgeschwindigkeiten der einzelnen Nikkomycine blieb während des feeding-Prozesses nahezu konstant. Durch langsames Zudosieren der Glucose-haltigen feeding-Lösung, in Abhängigkeit vom Gelöstsauerstoffgehalt (pO_2) im Fermenter, trat zu keinem Zeitpunkt eine Sauerstofflimitierung ein. Mit einer "Katabolit-Repression" durch Glucose ist unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht zu rechnen.

Die Supplementierung der feeding-Lösung erfolgte zunächst mit L-Leucin, da im biologischen Test mit Mucor hiemalis aufgrund des hohen Ablesefehlers eine gleich gute Stimulation durch L-Leucin und L-Isoleucin vorgetäuscht worden war. Erst als die vergrößerte Kapazität der HPLC eine exakte Untersuchung aller anfallenden Proben erlaubte, wurde die bessere Stimulation durch L-Isoleucin entdeckt. Aus Kostengründen wurden nur wenige pO_2-feeding-Fermentationen wiederholt, die jedoch auch zeigten, daß L-Isoleucin der bessere Effektor ist.

Zur Klärung der Frage, welche Rolle den verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin bei der Nikkomycin-Bildung zukommt, wurde ein [U-^{14}C] Einbauversuch im resting-cell durchgeführt. Keine der drei L-Aminosäuren wurde jedoch selektiv ins Nikkomycin D bzw. Z,X eingebaut. Ein Er-

gebnis, das in einem anderen Labor bestätigt wurde (Sommer, 1981). Hiermit war die Überlegung, daß eine der drei Aminosäuren direkt bzw. eines ihrer Abbauprodukte ins Nikkomycin eingebaut wird, hinfällig und diesen Aminosäuren ist nur eine regulatorische Funktion bei der Nikkomycin-Bildung zuzuordnen.

Auffallend ist, daß Isoleucin, Leucin, Valin und Methionin einzeln Einfluß auf die Nikkomycin-Bildung nehmen und alle diese Aminosäuren zur gleichen Biosynthese-Familie gehören, die sich vom Pyruvat ableitet. Zu dieser Familie gehören noch Aspartat, Asparagin, Alanin, Threonin und Lysin. Die Biosynthese der homologen verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin wird bei allen Organismen weitgehend durch das gleiche Enzymbesteck katalysiert. Bei E. coli wird die Umwandlung von Aspartat zu Aspartylphosphat durch drei Isoenzyme katalysiert und jedes wird in seiner Aktivität durch Lysin, Methionin bzw. Threonin reguliert. Zwei Isoenzyme gibt es für die Homoserindehydrogenase, ein Methionin spezifisches und ein Threonin spezifisches. Bei Corynebacterium glutamicum ist die Situation einfacher: nur eine Aspartokinase ist Angriffspunkt einer multivalenten Hemmung durch Threonin und Lysin. Es gibt auch nur eine Homoserindehydrogenase (Hütter, 1979). Zusätzlich erfolgt bei den Bakterien eine feedback-Hemmung im ersten Schritt der Biosynthese durch die Endprodukte: Methionin hemmt die Homoserin-Acyltransferase, Lysin die Dihydrodipicolinat-Synthase, Isoleucin die Threonin-Dehydratase, Leucin die Isopropyl-malat-Synthase und Valin die Acetolactat-Synthase.

Eine Kombinationsverfütterung dieser Aminosäuren aus der Pyruvat-Familie brachte keine weiteren Erkenntnisse über die regulatorische Beeinflussung der Nikkomycin-Synthese.

In der Literatur sind einige Fälle beschrieben, in denen durch Metabolite des Primärstoffwechsels eine Induktion der Biosynthese eines sekundären Metaboliten postuliert wird. Es ist oft schwierig, eine Induktion von einem blos-

sen stimulatorischen Effekt zu unterscheiden. Als Regel läßt sich festhalten, daß ein Induktor während der Wachstumsphase wirken sollte und daß Strukturanaloge des Metaboliten ebenfalls eine Wirkung zeigen sollten (Martin and Demain, 1980).

Als Beispiel sei hier die induzierende Wirkung von L-Methionin auf die Cephalosporin C-Synthese genannt. L-Methionin wirkt nur stimulierend, wenn es vor Beginn der Produktionsphase verabreicht wird. Norleucin, ein Analoges des Methionin, induziert ebenfalls (Drew and Demain, 1975).

L-Isoleucin wurde nun zu verschiedenen Zeiten dem Medium zugesetzt. Erst bei Supplementierung nach der 72. Fermentationsstunde konnte eine Stimulierung der Nikkomycin-Bildung beobachtet werden. Gibt man L-Isoleucin vorher, so tritt sogar eine Verzögerung der Nikkomycin-Synthese auf. L-Isoleucin hat somit keine Induktoreigenschaft.

Durch Anbieten von Strukturderivaten der verzweigtkettigen Aminosäuren sollten weitere Hinweise auf deren regulatorische Rolle bei der Nikkomycin-Bildung erwartet werden. Auffallend ist, daß Derivate, bei denen die Carboxylgruppe zur $-CH_2OH$ Gruppe reduziert war, ihre stimulierende Wirkung verloren. Isoleucinhydroxamat, das als Analoges von Isoleucin zur Selektion von Isoleucinhochleistungsstämmen verwendet wird (Wang et al., 1979), hemmte die Nikkomycin-Synthese sehr stark, ohne das Wachstum von Tü 901 zu beeinflussen. Hydroxamate sind außerdem gute Eisen-Komplexbildner; es wäre daher interessant, den Einfluß von Fe^{3+} auf die Nikkomycin-Produktion näher zu untersuchen.

Um die Funktion der verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Nikkomycin-Bildung näher zu charakterisieren, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine Aminosäurepoolbestimmung durchgeführt.
Bei der Cephalosporin C-Synthese bei Cephalosporium acremonium konnte zu Beginn der Produktion ein zeitweise erhöhter Methionin-Pool festgestellt werden. Es wurde daraus der Schluß gezogen, daß eine Anhäufung des internen Methio-

nin-Pools vor Beginn der Cephalosporin C-Synthese einen Trigger-Mechanismus zur Anschaltung der Synthese darstellt (Matsumura et al., 1980).

Für die Neomycin-Bildung bei Streptomyces fradiae ist ein großer Glutamat-Pool essentiell (Okazaki et al., 1973).

Beim Nikkomycin-Produzent Tü 901/8c ist der Pool an L-Leucin während der Produktionsphase überraschend hoch. Die Konzentration an L-Valin und L-Isoleucin ist ebenfalls relativ hoch. Bemerkenswert ist der geringe Pool an aromatischen Aminosäuren. Parallel zum Absinken des anfangs hohen Glutamat-Pools endet das Wachstum und die Nikkomycin-Bildung beginnt. Berücksichtigt man, daß durch Supplementierung mit L-Isoleucin gegen Ende der Produktionsphase eine Steigerung der Nikkomycin-Ausbeute erfolgt, so scheint diesem "Stau" an verzweigtkettigen Aminosäuren eine wichtige, die Nikkomycin-Bildung stimulierende Funktion zuzukommen.

Obwohl die Untersuchungen zur Nikkomycin D Biosynthese noch nicht abgeschlossen sind, deutet sich eine Erklärungsmöglichkeit für die stimulierende Wirkung der verzweigtkettigen Aminosäuren auf die Nikkomycin-Bildung an. Sommer (1981) erhielt durch Anbieten von radioaktiv markiertem L-Threonin und L-Lysin einen erhöhten Einbau dieser Aminosäuren ins Nikkomycin D im Vergleich zu anderen Aminosäuren. Sie postuliert den Einbau von L-Lysin in den Pyridin-Ring und von L-Threonin in die verzweigte Aminosäure-Seitenkette des Nikkomycin D. Beim Etamycin wurde für die Biosynthese des Pyridin-Rings ebenfalls eine Beteiligung von L-Lysin beschrieben (Hook and Vining, 1973).

Eine Stimulation der Nikkomycin-Synthese könnte man sich derart vorstellen, daß die Threonin-Dehydratase allosterisch durch L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin gehemmt wird. Changeux (1963) konnte für E. coli K12 eine Hemmung dieses Enzyms durch alle drei Aminosäuren in unterschiedlicher Weise nachweisen. Somit würde bei Streptomyces

tendae in Gegenwart von L-Isoleucin ein Stau an L-Threonin entstehen, der in die Nikkomycin-Synthese abgeleitet werden kann.

Bei E. coli K12 wird die Threonin-Dehydratase durch L-Isoleucin vollständig, durch L-Leucin zu 27 % und durch L-Valin zu 6 % gehemmt. Dies würde auch die stimulierende Wirkung aller drei Aminosäuren auf die Nikkomycin-Bildung verständlich machen. Die hemmende Wirkung von L-Methionin könnte durch Inhibierung der Aspartokinase, bzw. eines Isoenzyms der Aspartokinase, erklärt werden. Als Folge wäre die Bereitstellung von Lysin bzw. Threonin behindert.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit des stimulierenden Effektes von L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin auf die Nikkomycin-Synthese wäre in Analogie zur Biosynthese von Blasticidin S und Negamycin zu sehen (Seto et al., 1968; Kondo et al., 1971): bei beiden Antibiotika treten leucylierte Verbindungen während der Biosynthese auf. Die Leucylgruppe wird später wieder abgespalten.

Wie schon erwähnt (Abbildung 3), kann man annehmen, daß die Biosynthese von Nikkomycin C_Z gleich abläuft wie beim Polyoxin C: ausgehend von Uridin und Phosphoenolpyruvat in mehreren Reaktionsschritten. Zur Biosynthese von Nikkomycin C_X, mit 4-Formyl-4-imidazolin-2-on als Base, wurden noch keine radioaktiven Einbauversuche unternommen. Langhärig (1980) konnte jedoch durch Verfütterung von Histidinol bei einer Histin-auxotrophen Mutante, die kein Nikkomycin X mehr produzierte, die Fähigkeit zur X-Produktion wiederherstellen. Durch Histidinol-Verfütterung konnte er auch beim Wildtyp eine Steigerung der Nikkomycin X Ausbeute erreichen.

Andererseits wird durch Verfütterung von Uracil die Nikkomycin X Synthese total reprimiert, gleichgültig zu welchem Zeitpunkt die Uracil-Zugabe erfolgt. Bei Verfütterung von Uracil von Anfang an konnte erstmals X-freies Nikkomycin Z fermentiert werden. Gab man Uracil nach Beginn der Nikkomy-

cin X Synthese, so wurde diese abrupt eingestellt.

Nach König (1980) sollen sich Nikkomycin Z und X auch in der Konformation unterscheiden: C_X soll ein α-Glycosid der Talose, C_Z ein β-Glycosid der Allose sein, was zusätzliche Probleme in der Biosynthese bringen würde.

Als Ergänzung zur de novo Synthese der Nucleotide existiert bei vielen Organismen ein Weg, der als "salvage pathway" bekannt ist. Über diese Wege können Purine und Pyrimidine direkt in die entsprechenden Nucleotide überführt werden:

A. Base + Ribose-1-phosphat $\rightleftharpoons$ Nucleosid + P_i
Die Reaktion wird durch eine Nucleotid-Phosphorylase katalysiert.

B. Base + Phospho-ribosyl-pyrophosphat $\rightleftharpoons$ 5'-Nucleotid + Pyrophosphat
Die Reaktion wird durch eine Nucleotid-Pyrophosphorylase katalysiert.

C. Nucleosid + ATP $\rightleftharpoons$ 5'-Nucleotid + ADP
Die Reaktion wird durch eine Nucleotid-Phosphokinase katalysiert.

Von diesen Enzymen ist die Nucleotid-Pyrophosphorylase bei einigen Organismen das wichtigste Enzym (Ogata et al., 1976).

Bei der Nikkomycin C Synthese könnte eventuell eine Konkurrenz-Reaktion zwischen Uracil und Histidinol um Phospho-ribosyl-pyrophosphat vorliegen. Durch Erhöhung der Uracil-Konzentration würde das Gleichgewicht vollständig zur Synthese von Uridin verschoben, welches wiederum Vorstufe von Nikkomycin C_Z ist.
Andererseits findet unter Uracil-limitierten Bedingungen nur eine Produktion von Nikkomycin X statt (s. resting-cell Versuche).

Im resting-cell konnte gezeigt werden, daß nach Verfütterung von Uracil die Nikkomycin Z Produktion noch zusätzlich durch L-Isoleucin/L-Leucin gesteigert wird.

Bei einer pO_2-feeding-Fermentation zur selektiven Produktion von X-freiem Nikkomycin Z in Gegenwart von Uracil wurde daher L-Leucin der feeding-Lösung zugesetzt. Unter den standardisierten Bedingungen im instrumentierten 20 l Fermenter konnte erstmals gegenüber den Fermentationen ohne Uracil-Zusatz eine Steigerung der Produktbildungsgeschwindigkeit erreicht werden. Während die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit ohne Uracil-Verfütterung auf komplexem Medium für Nikkomycin Z bei 2,3 mg/l/Stunde und für Nikkomycin X bei 6,8 mg/l/Stunde, also insgesamt bei 9,1 mg/l/Stunde, lag, wurde bei der pO_2-feeding-Fermentation in Gegenwart von Uracil zu Beginn des Prozesses eine maximale Bildungsgeschwindigkeit für Nikkomycin Z von 13,3 mg/l/Stunde und nach Zudosierung von Leucin-haltiger feeding-Lösung eine maximale Bildungsgeschwindigkeit von 21,0 mg Nikkomycin Z erreicht. Die Ausbeute allein an X-freiem Nikkomycin Z lag nach 200 Stunden Fermentationszeit bei 3,2 g/l.

Dies zeigt deutlich, daß die Nikkomycin-Base einen wichtigen produktionslimitierenden Faktor darstellt. Darüberhinaus kann die Nikkomycin-Synthese durch feeden von Leucin-haltiger Glucose-Lösung zusätzlich erheblich gesteigert werden.

Im resting-cell wurde durch Erhöhung der Asparagin-Konzentration im Medium eine Reprimierung der Nikkomycin-Synthese beobachtet. Außerdem wurde je nach Konzentration die stimulierende Wirkung von L-Isoleucin gesenkt. Dies deutet darauf hin, daß die Nikkomycin-Synthese einer Regulation durch schnell verwertbare N-Quellen - als N-Katabolit-Regulation bezeichnet - unterliegt.

NH_4 reprimiert die Bildung vieler Enzyme, die an der Nutzung anderer N-Quellen beteiligt sind, beispielsweise Nitrit-Reduktase, Nitrat-Reduktase, extracelluläre Proteasen, Threonin-Dehydratase und Enzyme des Purin-Abbaus. - Die Leucomycin-Synthese bei Streptomyces kitasatoensis z.B. wird auf definierten Medien durch 2 mM NH_4SO_4 gehemmt (Omura, 1980).

Bei Streptomyces clavuligerus, einem β-Lactam-Produzenten, war unter Wachstumsbedingungen in Gegenwart von NH_4-Ionen die spez. Aktivität der Glutamin-Synthetase gering, die der Alanin-Dehydrogenase hoch. Unter diesen Bedingungen fand keine Antibiotika-Produktion statt. Wuchsen die Zellen jedoch auf Asparagin als einziger N-Quelle, was zu einer hohen Antibiotika-Produktion führte, war die spez. Aktivität der Glutamin-Synthetase hoch und die der Alanin-Dehydrogenase klein (Aharonowitz and Friedrich, 1980). Durch Zusatz von NH_4Cl zum Asparagin-haltigen Medium wurde die Antibiotika-Produktion um 80 % reduziert (Aharonowitz, 1979).

Gräfe et al. (1980) fanden bei Streptomyces noursei, einem Nourseothricin-Produzenten, durch Anthranilat eine starke Stimulierung. Sie postulierten folgenden Mechanismus: Anthranilat unterdrückt spezifisch die Bildung von Cytochrom a Oxidase; dies führt zu einem verminderten Transport von L-Alanin und L-Glutaminsäure in die Zelle, was eine Verminderung des N-Katabolismus zur Folge hat. Dadurch könnte eine N-Repression aufgehoben werden. Durch Anthranilat wurde im gleichen Stamm eine Reprimierung der Alanin-Dehydrogenase und eine Erhöhung der Glutamat-Dehydrogenase Aktivität gefunden (Gräfe et al., 1978). Außerdem wird die Bildung der Glutamat-Synthetase reprimiert (Gräfe et al., 1977).

In Gegenwart von kurzkettigen Alkoholen, Benzyl-Alkohol und TWEEN 20 konnte bei Streptomyces noursei ebenfalls eine Veränderung im N-Stoffwechsel erreicht werden. Neben der Verschiebung von Alanin-Dehydrogenase und Glutamin-Synthetase zu Glutamat-Dehydrogenase wurde auch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran beobachtet: der Anteil an gesättigten methyl-verzweigten Fettsäuren nahm ab, wohingegen der Anteil der olefinischen Fettsäuren zunahm (Gräfe et al., 1979).

Durch Supplementation des Mediums mit Ölsäure oder Palmitinsäure wurde bei einem Streptomyceten-Stamm eine Erhö-

hung des Aminosäure-Pools um Faktor 4-10, speziell des Glutamat-Pools, festgestellt. Außerdem änderte sich das Fettsäurespektrum der Membran. Bei diesem Stamm wurde in Gegenwart von Ölsäure die Synthese eines Antibiotikums induziert (Okazaki et al., 1974).

Kürzlich wurde beschrieben, daß die mikrobielle Umsetzung von Glycin zu L-Serin durch Magnesium-Phosphat stimuliert wird. Als Ursache wurde angenommen, daß Magnesium-Phosphat die N-Katabolit-Regulation beeinflußt (Tanaka et al., 1980). Die Produktion von Leucomycin, Tylosin und Spiramycin wurde in Gegenwart von Magnesium-Phosphat (1 %) um einen Faktor 2-100 gesteigert. Es konnte gezeigt werden, daß die NH_4-Ionen-Konzentration während der gesamten Fermentationszeit durch Magnesium-Phosphat erniedrigt war (Omura et al., 1980). Magnesium-Phosphat scheint freie NH_4-Ionen zu komplexieren. Magnesium-Phosphat sollte daher in nächster Zeit zur Vermeidung einer N-Katabolit-Regulation bei Antibiotika-Optimierungen eine gewisse Bedeutung erlangen. Bei Produzenten, die einer strengen Kontrolle durch Phosphat-Ionen unterliegen, kann es jedoch nicht eingesetzt werden.

Sieht man einmal davon ab, daß die Produktion eines Antibiotikums durch die Bereitstellung entsprechender Enzyme, durch schlechte Ausscheidung des Produktes bzw. durch dessen Toxizität auf den Organismus selbst limitiert sein kann, so liegt wohl in den meisten Fällen regulationsbedingt ein Engpaß in der Bereitstellung von intermediären Stoffwechselmetaboliten für die Biosynthese des Antibiotikums vor. Dieser Pool an Vorstufen kann durch Induktion und Repression einerseits, Aktivierung und Inhibition andererseits bestimmter kataboler und anaboler Stoffwechselwege vielfältig verändert werden. Nach Aufklärung der Biosynthese und Untersuchungen zur Regulation eines sekundären Stoffwechselmetaboliten stellt die gezielte genetische Bearbeitung eines Produzenten zur Deregulierung der

beteiligten Stoffwechselwege eine Hauptaufgabe für den industriell tätigen Mikrobiologen dar.

Analog-resistente Mutanten sind ein gutes Werkzeug, um die Ausbeute von Antibiotika-Produzenten, durch Ausschaltung von Regulationsmechanismen, zu steigern.

So konnte bei Streptomyces lipmanii, einem Penicillin N und Cephamycin Produzenten, durch Isolierung von Trifluorleucin-resistenten Stämmen, eine 6fache Steigerung der Cephamycin-Produktion erreicht werden (Godfrey, 1973). Für die Biosynthese werden α-Aminoadipinsäure, Cystein und Valin benötigt. Der Trifluorleucin-resistente Stamm ist dereguliert in der Aminosäurebiosynthese der Aspartat-Pyruvat-Familie, er scheidet große Mengen Leucin aus.

Es konnte nachgewiesen werden, daß Mutanten, die aus industriellen Screening-Programmen stammen, anormal reguliert sind. So zum Beispiel war die Acetohydroxysäure-Synthetase, das erste Enzym der Valin-Biosynthese, bei einer Hochleistungsmutante von Penicillium chrysogenum, dem Penicillin-Produzenten, weniger sensitiv gegenüber Valin als das gleiche Enzym eines niedrigen Produzenten (Goulden and Chattaway, 1969). Valin fiel somit für die Penicillin-Biosynthese in größeren Konzentrationen als Vorstufe an.

Luengo et al. (1979) beschreiben eine unterschiedliche Regulation der Lysin Biosynthese bei Hochleistungsstämmen und bei Stämmen mit niedriger Penicillin-Syntheseleistung.

Ziel einer weiteren genetischen Bearbeitung des Nikkomycin-Produzenten Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901 sollte eine Poolerhöhung der folgenden Metabolite sein:

1. der Base; Uracil als direkter Vorstufe für Nikkomycin Z und/oder Histidinol als wahrscheinlicher Vorstufe für Nikkomycin X
2. Ribose; als Substrat des "salvage pathway"
3. L-Lysin und L-Threonin; unter dem Vorbehalt, daß sie nachweislich Vorstufen von Nikkomycin D sind.

Zur Erhöhung der Histidinol-Konzentration würde eine Mutante beitragen, die folgendermaßen zu charakterisieren ist: Histidin auxotroph, defekt in Histidinol-Dehydrogenase und Aufhebung der feedback-Hemmung durch exogen zudosiertes Histidin.

Bei Isolierung von Shikimisäure-auxotrophen Mutanten einer Bacillus Art, bzw. einer Mutante, die D-Gluconat nicht verwerten konnte, wurde erstmals die Ausscheidung hoher D-Ribose-Konzentrationen ins Medium beschrieben (Sasajima and Yoneda, 1974). Durch Setzen einer ähnlichen Mutation bei Tü 901 könnte die Bereitstellung von Ribose-5-Phosphat bzw. Phospho-ribosyl-pyrophosphat für die Nikkomycin-Synthese verbessert werden.

Bei Bestätigung der Hypothese, daß L-Threonin und L-Lysin Vorstufen der Nikkomycin D Biosynthese sind, sollte versucht werden, den Pool dieser Aminosäuren anzuheben. Durch Suchen nach ß-Hydroxynorvalin resistenten Stämmen bei Brevibacterium flavum wurden Mutanten gefunden, die Threonin in großen Mengen produzierten (Alikhanian, 1975). ß-Hydroxynorvalin hemmt übrigens Tü 901 im Wachstum (unveröffentlichtes Ergebnis).

S-(2-Aminoäthyl)-L-Cystein, als toxisches Analoges von L-Lysin, wurde erfolgreich zur Selektion von Mutanten eingesetzt, bei denen die feedback-Hemmung der Aspartokinase durch L-Lysin aufgehoben war (Sano and Shiio, 1970). Borrelidin resistente Stämme bei Saccharomyces cerevisiae besaßen ebenfalls eine veränderte Aspartokinase (Poralla et al., 1981). Der Threonin-Pool dieser Stämme war um Faktor 22 erhöht.

Bei Stämmen, die für Methionin auxotroph sind, eine mutierte Threonindehydratase aufweisen und gleichzeitig eine deregulierte Aspartokinase besitzen, sollte der Metabolitfluß nach Verfütterung von Asparagin gänzlich nach L-Lysin und L-Threonin umgeleitet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Am Nikkomycin-Produzent Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901 wurden Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycin-Bildung in Hinblick auf eine Ausbeutesteigerung und Optimierung einer pO_2-feeding-Fermentation durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Nikkomycin-Produktion einer Kontrolle durch Phosphat-Ionen unterliegt.

In einem speziell für Untersuchungen der Nikkomycin-Synthese entwickelten resting-cell System wurde eine starke Stimulierung der Nikkomycin-Bildung durch die L-Aminosäuren Isoleucin (+585 %), Leucin (+235 %) und Valin (+170 %) gefunden.

Durch Anbieten von ^{14}C-markiertem L-Isoleucin, L-Leucin bzw. L-Valin konnte kein selektiver Einbau einer der drei Aminosäuren ins Nikkomycin D nachgewiesen werden.

Andererseits führte L-Methionin zu einer Hemmung der Synthese bisher bekannter Nikkomycine.

Bei Berücksichtigung aller bisher vorliegenden Informationen zur Nikkomycin D Biosynthese könnten L-Isoleucin, L-Leucin, L-Valin und L-Methionin die Bereitstellung der L-Aminosäuren Threonin und Lysin für die Nikkomycin-Produktion regulatorisch beeinflussen.

Durch Entwicklung einer phosphatlimitierten pO_2-feeding-Fermentation und unter Zusatz von L-Isoleucin bzw. L-Leucin zur feeding-Lösung gelang es, die Phase der maximalen Produktbildungsgeschwindigkeit von 70 Stunden auf 200 Stunden zu verlängern und die Ausbeute an biologisch aktiven Nikkomycinen Z, X, I, J gegenüber dem batch-Prozeß von 0,7 g/l nach 110 Stunden auf 3,15 g/l nach 310 Stunden zu steigern.

Die Zudosierung von Uracil während der Produktionsphase reprimierte abrupt die Synthese der Nikkomycine mit 4-For-

myl-4-imidazolin-2-on als Base, wohingegen die Bildung der Nikkomycine aus der Uracil-Reihe stark stimuliert wurde.

In Gegenwart von Uracil im Medium und mit L-Leucin in der feeding-Lösung wurde erfolgreich eine "gerichtete" pO_2-feeding-Fermentation zur selektiven Produktion von Nikkomycin Z durchgeführt. Dabei konnte im Vergleich zum batch-Prozeß ohne Uracil die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit erheblich gesteigert werden: in der Fermentationsphase I (bis zur 100. Stunde) durch Uracil auf 13,3 mg Nikkomycin Z/l/Stunde und in der Fermentationsphase II (nach Beginn des pO_2-feedings) durch Uracil und Leucin auf 21,0 mg Nikkomycin Z/l/Stunde. Die Ausbeute allein an X-freiem Nikkomycin Z betrug nach 200 Stunden Fermentationszeit 3,2 g/l.

X-freies Nikkomycin Z konnte mit Hilfe dieses Fermentationsprozesses erstmals in großen Mengen zur biologischen Charakterisierung isoliert werden.

Im resting-cell wurden Hinweise auf eine N-Katabolit-Regulation der Nikkomycin-Synthese gefunden.

VI. LITERATUR

Aharonowitz, Y.:
Regulatory interrelationships of nitrogen metabolism and Cephalosporin biosynthesis.
In O. Sebek and A.J. Laskin (eds.), Genetics of industrial microorganisms. p. 210-217, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1979)

Aharonowitz, Y. and Demain, A.L.:
Influence of inorganic phosphate and organic buffers on Cephalosporin production by Streptomyces clavuligerus.
Arch. Microbiol. 115, 169-173 (1977)

Aharonowitz, Y. and Demain, A.L.
Carbon catabolite regulation of Cephalosporin production in Streptomyces clavuligerus.
Antimicrob. Agents Chemother. 14, 159-164 (1978)

Aharonowitz, Y. and Demain, A.L.:
Nitrogen nutrition and regulation of Cephalosporin production in Streptomyces clavuligerus.
Can. J. Microbiol. 25, 61-67 (1979)

Aharonowitz, Y. and Demain, A.L.:
Thoughts on secondary metabolism.
Biotechnol. Bioeng. 22, Suppl. 1, 5-9 (1980)

Aharonowitz, Y. and Friedrich, C.:
Alanine dehydrogenase of the β-lactam antibiotic producer Streptomyces clavuligerus.
Arch. Microbiol. 125, 137-142 (1980)

Alikhanian, S.I.
The role of regulatory mutations in development of high-yielding microbial strains.
In: Proceedings of the first intersectional Congress of IAMS, Vol 5, Science Council of Japan (1975)

Auden, J.A.L. and Küenzi, M.:
i. First European Congress on Biotechnology. Preprints. Strategy in the development of a new secondary metabolite fermentation procedure.
Published by: DECHEMA, Deutsche Gesellschaft für chemisches Apparatewesen e.V. Frankfurt/M. (1978)

Auterhoff, H. und Lohmann, V.:
Die Perjodatreaktion in der pharmazeutischen Analyse.
Deutsche Apothekerzeitung 40, 904-905 (1957)

Bauer, K., Bischoff, E., v. Hugo, H., Berg, D., und Kraus, P.:
Pflanzenschutzpräparate mikrobiologischer Herkunft.
In Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfung (Ed. R. Wegler) p. 215-328 (1981) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Brillinger, G.U.:
Metabolic products of microorganisms. 181. Chitin synthase from fungi, a test model for substances with insecticidal properties.
Arch. Microbiol. 121, 71-74 (1979)

Changeux, J.P.:
Allosteric interactions on biosynthetic L-threonine deaminase from E. coli K 12.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 497-504 (1963)

Cohen, E. and Casida, J.E.:
Inhibition of Tribolium gut chitin synthetase.
Pestic. Biochem. Physiol. 13, 129-136 (1980)

Dähn, U., Hagenmaier, H., Höhne, H., König, W.A. und Zähner, H.:
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 154. Mitteilung. Nikkomycin, ein Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen.
Arch. Microbiol. 107, 143-160 (1976)

Dehler, W.:
Nikkomycine - Studien zur Fermentation und Isolierung.
Dissertation, Universität Tübingen (1979)

Delzer, J.:
Untersuchungen des Nikkomycinmusters bei fünf verschiedenen Mutanten von Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901.
Diplomarbeit, Universität Tübingen (1980)

Demain, A.L.:
Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabilites.
J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 345-362 (1972)

Demain, A.L. and Kennel, Y.M.:
Resting-cell studies on carbon-source regulation of β-lactam antibiotic biosynthesis.
J. Ferment. Technol. 56, 323-328 (1978)

Demain, A.L., Kennel, Y.M. and Aharonowitz, Y.:
Carbon catabolite regulation of secondary metabolism.
In: Microbial Technology: Current state, future prospects (Bull, A.T., Ellwood, D.C. and Ratledge, C., Eds.), pp. 163-185, Cambridge University Press, London

Demain, A.L. and Masurekar, P.S.:
Lysine inhibition of in vivo homocitrate synthesis in Penicillium chrysogenum.
J. Gen. Microbiol. 82, 143-151 (1974)

Drew, S.W. and Demain, A.L.:
Effect of primary metabolites on secondary metabolism.
Ann. Rev. Microbiol. 31, 343-356 (1977)

Feren, C.J. and Squires, R.W.:
The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis of Capreomycin and Cephalosporin C.
Biotechnol. Bioeng. 11, 583-592 (1969)

Fiedler, H.-P.:
Quantitation of Nikkomycins in biological fluids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid. chromatography
J. Chromatogr. 204, 313-318 (1981)

Gallo, M. and Katz, E.:
Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose.
J. Bacteriol. 109, 659-667 (1972)

Gil, J.A., Liras, P., Nahrro, G., Villanueva, J.R. and Martin, J.F.:
Regulation by aromatic amino acids of the biosynthesis of candicidin by Streptomyces griseus.
J. Gen. Microbiol. 118, 189-195 (1980)

Godfrey, O.W.:
Isolation of regulatory mutants of the aspartic and pyruvic acid families and their effect on antibiotic formation in Streptomyces lipmanii.
Antimicrob. Agents Chemother. 4, 73-79 (1973)

Goulden, S.A. and Chattaway, F.W.:
End-product control of acetohydroxy acid synthetase by valine in Penicillium chrysogenum A176 and a high penicillin-yielding mutant.
J. Gen. Microbiol. 59, 111-118 (1969)

Gräfe, U., Bocker, H. and Thrum, H.:
Regulative influence of o-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of Streptomyces noursei JA3890 b. II. Regulation of glutamine synthetase and the role of the glutamine synthetase / glutamate synthetase pathway.
Z. Allg. Mikrob. 17, 201-209 (1977)

Gräfe, U., Bocker, H., Reinhardt, G. and Thrum, H.:
Regulative influence of o-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of Streptomyces noursei JA3890 b. III. Change of redox state of nicotinamide-adenine-dinucleotides in the presence of aminobenzoic acids.
Z. Allg. Mikrobiol. 18, 479-486 (1978)

Gräfe, U., Bocker, H. und Thrum, H.:
Regulation der Glutamin-Synthetasebildung in Streptomyceten.
Z. Allg. Mikrobiol. 19, 663-666 (1979)

Gräfe, U., Schade, W., Bocker, H. and Thrum, H.:
Alcohol-induced switching over of metabolic flux in Streptomyces noursei JAO 3890 b.
Z. Allg. Mikrobiol. 19, 721-726 (1979)

Gräfe, U., Steudel, A., Bocker, H. and Thrum, H.:
Regulative influence of o-aminobenzoic acid (OABA) on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of Streptomyces noursei JA3890 b. V. Effect of OABA on cytochrome levels and amino acid transport.
Z. Allg. Mikrobiol. 20, 185-194 (1980)

Grund, A.D. and Ensign, J.C.:
Role of carbon dioxide in germination of spores of Streptomyces viridochromogenes.
Arch. Microbiol. 118, 279-288 (1978)

Hasenböhler, A.:
Instrumentierung von Fermentationsanlagen.
Dissertation, Universität Tübingen (1978)

Höhne, H.:
Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese.
Dissertation, Universität Tübingen (1974)

Hook, D. and Vining, L.:
Biosynthesis of the peptide antibiotic etamycin. Origin of the 3-hydroxypicolinyl and amino-acid fractions.
J.C.S. Chem. Comm. 185-186 (1973)

Hopwood, D.A. and Merrick, M.J.:
Genetics of antibiotic production.
Bacteriol. Rev. 41, 595-635 (1977)

Hütter, R.:
Regulation of primary metabolism.
In: Genetics of industrial microorganisms (Eds. O.K. Sebek and A.I. Laskin) American Society for Microbiology 44-53 (1979)

Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Nuesch, J. und Zähner, H.:
Scopamine.
Arch. Mikrobiol. 51, 1-8 (1965)

Isono, K., Sato, T., Hirasawa, K., Funayama, S., Suzuki, S.:
Biosynthesis of the nucleoside skeleton of polyoxins.
J. Am. Chem. Soc. 100, 3937-3939 (1978)

Isono, K. and Suzuki, S.:
The Polyoxins: pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis.
Heterocycles 13, 333-351 (1979)

Kao, E.J.:
A feed model for a nongrowth associated fermentation.
Biotechnol. Bioeng. 18, 1493-1495 (1976)

Keckeisen, G.:
Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Nikkomycine.
Dissertation, Universität Tübingen (1979)

Kobinata, K., Uramoti, M., Nishii, M., Kusakabe, H., Nakamura, G. and Isono, K.:
Neopolyoxins A, B and C - new chitin synthetase inhibitors.
Agric. Biol. Chem. 44, 1709-1711 (1980)

König, W.A., Pfaff, K.-P., Bartsch, H.H., Schmalle, H. und Hagenmaier, H.:
Konfiguration von 2-Amino-4-hydroxy-4-(5-hydroxy-2-pyridyl)-3-methylbuttersäure, der N-terminalen Aminosäure der Nikkomycine.
Liebigs Ann. Chem. 1728-1735 (1980)

Kondo, S., Yamamoto, H., Maeda, K. and Umezawa, H.:
Leucylnegamycin, an antibiotic from Negamycin-producing Streptomyces.
J. Antibiotics 24, 732-734 (1971)

König, W.A.:
persönliche Mitteilung

Küenzi, M.T.:
Process design and control in antibiotic fermentations.
In: Antibiotics and other secondary metabolites.
p. 39-56. R. Hütter, T. Leisinger, J. Nüesch and W. Wehrli (eds.), London-New York-San Francisco: Academic Press (1978)

Küenzi, M.T.:
Regulation of Cephalosporin synthesis in Cephalosporium acremonium by phosphate and glucose.
Arch. Microbiol. 128, 78-83 (1980)

Langhärig, J.:
Aufstellung eines Produktionsspektrums von Tü901 - Streptomyces tendae Ettlinger.
Diplomarbeit, Universität Tübingen (1979)

Langhärig, J.:
persönliche Mitteilung

Langheinrich, W. and Ring, K.:
Regulation of amino acid transport in growing cells of Streptomyces hydrogenous.
Arch. Microbiol. 109, 227-235 (1976)

Lehninger, A.L.:
Biochemie.
2. Auflage, Verlag Chemie - Weinheim-New York (1977)

Liras, P., Villanueva, J.R. and Martin, J.F.:
Sequential expression of macromolecule biosynthesis and candicidin formation in Streptomyces griseus.
J. Gen. Microbiol. 102, 269-277 (1977)

Luengo, J.M., Revilla, G., Villanueva, J.R. and Martin, J.F.:
Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of Penicillium chrysogenum.
J. Gen. Microbiol. 115, 207-211 (1979)

Martin, J.F.:
Control of antibiotic synthesis by phosphate.
Adv. Biochem. Eng. 6, 105-127 (1977)

Martin, J.F.:
Manipulation of gene expression in the development of antibiotic production.
In: Antibiotics and other secondary metabolites, p. 19-37 (eds. Hütter, Leisinger, Nüesch and Wehrli)
Academic Press (1978)

Martin, J.F. and McDaniel, L.E.:
The submerged culture production of the polyene antifungal antibiotics candidin and candihexin.
Dev. Ind. Microbiol. 15, 324-337 (1974)

Martin, J.F. and Demain, A.L.:
Control by phosphate of candicidin production.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1103-1109 (1976)

Martin, J.F. and Demain, A.L.:
Control of antibiotic biosynthesis.
Microbiol. Rev. 44, 230-251 (1980)

Martin, J.F. and Liras, P.:
Rapid incorporation of precursors into candicidin by resting cells of Streptomyces griseus.
J. Antibiot. 29, 1306-1309 (1976)

Martin, J.F., Naharro, G., Liras, P. and Villanueva, J.R.:
Isolation of mutants deregulated in phosphate control of candicidin biosynthesis.
J. Antibiot. 32, 600-606 (1979)

Massey, L., Sokatch, J. and Conrad, R.:
Branched-chain amino acid catabolism in bacteria.
Bacteriol. Rev. 40, 42-54 (1976)

Matsumura, M., Imanaka, T., Yoshida, T. and Taguchi, H.:
Regulation of Cephalosporin C production by endogenous methionine in Cephalosporium acremonium.
J. Ferment. Technol. 58, 205-214 (1980)

Müller, H.:
persönliche Mitteilung

Ogata, K., Kinoshita, S., Tsundoda, T. and Aida, K.:
Salvage synthesis of nucleotides.
In: Microbial production of nucleic acid-related substances.
John Wiley & Sons (1976)

Okazaki, H., Ono, H., Yamada, K., Beppu, T. and Arima, K.:
Relationship among cellular fatty acid composition, amino acid uptake and neomycin formation in a mutant strain of Streptomyces fradiae.
Agr. Biol. Chem. 37, 2319-2325 (1973)

Okazaki, H., Beppu, T. and Arima, K.:
Induction of antibiotic formation in Streptomyces sp. No. 362 by the change of cellular fatty acid spectrum.
Agr. Biol. Chem. 38, 1455-1461 (1974)

Omura, S., Tanaka, Y., Kitao, C., Tanaka, H. and Iwai, Y.:
Stimulation of Leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation.
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 691-695 (1980)

Pan, C.H., Hepler, L. and Elander, R.P.:
Control of pH and carbohycrate addition in the Penicillin fermentation.
Dev. ind. Microbiol. 13, 103-112 (1972)

Perlman, D.:
In: The history of penicillin production.
Chemical Engineering Progress Symposium Series 100, 66, 24 (1970)

Perlman, D.:
Microbial production of antibiotics.
In: Microbial Technology - Microbial Processes.
Second Edition, Vol. 1 (Eds.: Peppler and Perlman)
Academic Press, 241-281 (1979)

Pirt, S.J. and Righelato, R.C.:
Effect of growth rate on the synthesis of Penicillin by Penicillium chrysogenum in batch and chemostat cultures.
Appl. Microbiol. 15, 1284-1290 (1967)

Poralla, K., Seibold, M. and Nill, K.:
Homoserine and threonine pools of Borrelidin resistant Saccharomyces cerevisiae mutants with an altered aspartokinase.
in press

Queener, S. and Swartz, R.:
Penicillins: biosynthetic and semisynthetic.
In: Economic Microbiology, Vol. 3, Secondary Products of Metabolism (ed. Rose), Academic Press (1979)

Ragan, C.M. and Vining, L.C.:
Intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and streptomycin production in cultures of Streptomyces griseus.
Can. J. Microbiol. 24, 1012-1015 (1978)

Rose, A.H.:
In: Secondary products of metabolism.
Economic Microbiology, Vol. 3 (Ed. Rose), Academic Press (1979)

Sankaran, L. and Pogell, B.H.:
Biosynthesis of puromycin in Streptomyces alboniger: regulation and properties of o-demethylpuromycin-o-methyltransferase.
Antimicrob. Agents Chemother. 8, 721-732 (1975)

Sano, K. and Shiio, I.:
Microbial production of L-lysine. III. Production by mutants resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine.
J. Gen. Appl. Microbiol. 16, 373-391 (1970)

Sasajima, K. and Yoneda, M.:
D-Sedoheptulose-7-phosphate: D-Glyceraldehyde-3-phosphate glycol-aldehydetransferase and D-Ribulose-5-phosphate 3-epimerase mutants of a Bacillus species.
Agr. Biol. Chem. 38, 1305-1310 (1974)

Seto, H., Otake, N. and Yonehara, H.:
Studies on the biosynthesis of Balsticidin S.
Part II. Leucylblasticidin S, a metabolic intermediate of Blasticidin S biosynthesis.
Agr. Biol. Chem. 32, 1299-1305 (1968)

Soltero, F.V. and Johnson, M.J.:
Continuous addition of glucose for evaluation of penicillin-producing cultures.
Appl. Microbiol. 2, 41-44 (1954)

Sommer, U.:
persönliche Mitteilung - 1981

Speedie, M.K. and Park, M.O.:
Regulation of tyrosine biosynthesis by phenylalanine in anthramycin-producing Streptomyce refuineus.
J. Antibiot. 33, 579-584 (1980)

Squires, R.W.:
Regulation of the Penicillin fermentation by means of a submerged oxygen-sensitive electrode.
Dev. Ind. Microbiol. 13, 128-135 (1972)

Tanaka, Y., Araki, K. and Nakayama, K.:
Stimulation of microbial conversion of glycine into L-serine by magnesium phosphate.
J. Ferment. Technol. 58, 189-195 (1980)

Townsend, M.E., Wright, H.M. and Hopwood, D.A.:
Efficient mutagenesis by near ultraviolet light in the presence of 8-methoxypsoralen in Streptomyces.
J. Appl. Bact. 34, 799-801 (1971)

Virgilio, A., Marcelli, E. and Agrimino, A.:
Aeration-agitation studies on the Rifamycin fermentation.
Biotechnol. Bioeng. 6, 271-283 (1964)

Walker, M.W. and Walker, J.B.:
Streptomycin biosynthesis. Separation and substrate specifities of phosphatases acting on guanidino-deoxy-scyllo-inositol phosphate and streptomycin-(streptidino)phosphate.
J. Biol. Chem. 246, 7034-7040 (1971)

Wang, D., Cooney, C., Demain, A., Dunnill, P., Humphrey, A. and Lilly, M.:
Biosynthesis of secondary metabolites.
In: Fermentation and Enzyme Technology. (ed. Hedén), John Wiley & Sons, p. 26-36 (1979)

Yoshida, F., Yamane, T., Nakamoto, K.:
Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed.
Biotechnol. Bioeng. 15, 257-270 (1973)

Zähner, H.:
The search for new secondary metabolites.
In: Antibiotics and other secondary metabolites. p. 1-17. (Eds.: R. Hütter, T. Leisinger, J. Nüesch and W. Wehrli), London-New York-San Francisco, Academic Press (1978)

Zähner, H. and Maas, W.K.:
Biology of antibiotics.
Springer-Verlag, Berlin (1972)

Zoebelein, G.:
AMS 0896, ein Antibiotikum mit entwicklungshemmenden Eigenschaften bei Spinnmilben.
Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Heft 191, 282 (1979)

Zoebelein, G.:
Freilandversuche mit AMS 0896 gegen Spinnmilben im Obstbau.
Vortrag, St. Gallen (1980)

Zoebelein, G.:
persönliche Mitteilung

Lebenslauf

13.2.1952	geboren in Essen
1958	Grundschule in Essen
1963	Eintritt ins neusprachliche Humboldt-Gymnasium, Essen
18.5.1972	Abitur
ab WS 1972	Beginn des Biologie-Studiums an der Ruhruniversität Bochum
8.10.1974	Vordiplom in Biologie, Bochum
ab WS 1974	Weiterstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
29.3.1978	Diplom in Biologie, Tübingen
ab April 1978	Anfertigung der Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner
16.3.1979	Eheschließung mit Brigitte Schneider
ab 1.9.1980	wissenschaftlicher Angestellter bei Prof. Dr. H. Zähner
27.2.1981	Geburt unserer Tochter Henriette

Meine akademischen Lehrer waren:

in Bochum:

N. Amrhein, L. Beck, R. Berzborn, E. Curio, K. Esser, F. Fortnagel, V. Hamann, K. Hamdorf. P. Heimbach, B. Hock, A. Kettrup, H.-G. Keyl, H. Langer, H. Luttgau, K. Märkel, H. Mergner, G. Pfleiderer, W. Rautenberg, A. Redhardt, G. Reißig, A. Richter, G. Rossmann, W. Rüger, A. Ruthmann, C. Soeder, J. Schwartzkopf, H. Specker, W.Traut, A. Trebst, W. Wackernagel, V. Winkler, M. Zenk

in Tübingen:

K. Altendorf, E. Bayer, W. Bessler, V. Braun, G.-V. Brillinger, W. Busch, D. Dütting, H. Hagenmaier, K. Handke, V. Hemleben, O. Klee, W. Löffler, H. Machleidt, D. Mecke, G.F. Meyer, K. Pelling, K. Poralla, S. Sarkar, M. Sauerbier, W. Seyffert, H.V. Schairer, D. Sperlich, H. Stegmann, H. Straub, H. Tichy, G. Weitzel, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, G. Vogel, H. Zähner, K. Zeller